

**Analyse der Mechanismen der Hemmung
des humanen LINE-1-Retrotransposons
durch die Cytidineaminasen
APOBEC3A und APOBEC3C**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main**

**von
Axel Volker Horn
aus Löbau**

**Frankfurt 2009
(D 30)**

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber (Johann Wolfgang Goethe-Universität)
Gutachter: Prof. Dr. Gerald Schumann (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
Prof. Dr. Rolf Marschalek (Johann Wolfgang Goethe-Universität)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Transponierbare Elemente im menschlichen Genom	1
1.1.1	DNA-Transposons.....	2
1.1.2	Endogene Retroviren	2
1.1.3	Non-LTR-Retrotransposons	4
1.1.4	Das humane Non-LTR-Retrotransposon LINE-1	7
1.1.5	Expression von L1-Genprodukten	10
1.1.6	Der Mechanismus der LINE-1-Retrotransposition	10
1.1.7	Der Einfluss von LINE-1-Retrotransposons auf die Organisation und Struktur des Säugergenoms.....	13
1.1.8	Mechanismen der intrazellulären Verteidigung gegen L1-vermittelte Retrotransposition	16
1.2	Die Familie der APOBEC-Cytidineaminasen	18
1.2.1	Die menschlichen APOBEC-Proteine.....	18
1.2.2	Die deaminaseabhängige und –unabhängige Mechanismen der Hemmung von HIVΔvif durch APOBEC3G	21
1.2.3	Die Hemmung der LINE-1-Retrotransposition durch APOBEC-Proteine ..	23
1.3	„Base Excision Repair“ (BER) und die APOBEC3-vermittelte Inhibition der HIV- Replikation	24
1.4	Ziele der Arbeit.....	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Plasmide	28
2.1.1	L1-Expressionsplasmide	28
2.1.2	APOBEC-Expressionsplasmide	30
2.2	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.1	Bakterienstämme	32
2.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
2.2.3	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	33
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
2.2.5	Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	34
2.2.6	PCR-Methoden	34
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	36
2.3	Zellkulturmethoden.....	37
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	37
2.3.2	Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen	38

2.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	38
2.3.4	L1-Retrotranspositionsreporterassay.....	39
2.3.5	Expression von L1-kodierten Proteinen mittels eines rekombinanten Vacciniavirus.....	39
2.4	Proteinbiochemische Methoden	41
2.4.1	Proteinpräparation aus eukaryotischen Zellen.....	41
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode.....	41
2.4.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.4.4	Immunoblotanalyse	43
2.4.5	Immunopräzipitation	45
2.4.6	Immunofluoreszenz.....	46
2.4.7	Auftrennung von Zelllysaten über einen Saccharosegradienten.....	47
2.5	Statistische Analysen	48
2.5.1	Charakterisierung der 5'-Enden 5'-verkürzter <i>de novo</i> L1-Insertionen	48
2.5.2	Identifizierung endogener, kanonischer, 5'-verkürzter L1-Kopien aus dem humanen Genom	49
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Arbeitshypothese zum Mechanismus der Hemmung der L1-Retrotransposition durch APOBEC3-Proteine	51
3.2	Prüfung des Arbeitsmodells mittels <i>in silico</i> -Analyse der 5'-Enden 5'-verkürzter L1-Insertionen	53
3.2.1	5'-verkürzte <i>de novo</i> L1-Insertionen enden bevorzugt unmittelbar nach einem L1-kodierten Guanin	53
3.2.2	Im humanen Genom manifestierte 5'-verkürzte L1-Insertionen enden häufiger als theoretisch erwartet unmittelbar nach einem L1-kodierten Guanin	55
3.3	Bestimmung des inhibitorischen Effekts von APOBEC3-Mutanten auf die L1- Retrotranspositionsaktivität	59
3.3.1	APOBEC3C-Mutanten mit inaktiver Deaminasedomäne inhibieren die L1- Retrotransposition	59
3.3.2	Mutanten der A3C-Deaminasedomäne unterscheiden sich von ihren korrespondierenden A3A-Mutanten in ihrem Einfluss auf die L1- Retrotransposition	61
3.3.3	Die A3C-Mutante R122A, die sich durch eine inaktivierte RNA-Bindetasche auszeichnet, hemmt die L1-Retrotransposition nicht	64
3.3.4	Dimerisierungsdefiziente APOBEC3C-Mutanten hemmen die L1- Retrotransposition nicht.....	68

3.4	Der Einfluss von APOBEC3-Proteinen auf die Ausdehnung von <i>de novo</i> L1-Insertionen	69
3.5	Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion zwischen APOBEC3-Proteinen und dem L1-Ribonukleoproteinkomplex	74
3.5.1	APOBEC3C und L1-ORF1p-Komplexe kolokalisieren in der gleichen Fraktion eines Saccharosegradienten	74
3.5.2	Nachweis der Kolokalisation von APOBEC3C und L1-ORF1p im Zytoplasma von HeLa- und 143B-Zellen mittels Immunofluoreszenzanalysen.....	77
3.5.3	Prüfung der Möglichkeit einer Interaktion zwischen APOBEC3A bzw. APOBEC3C und L1-ORF1p	80
3.5.4	Prüfung einer möglichen Interaktion zwischen APOBEC3A bzw. APOBEC3C und L1-ORF2p	85
3.6	Bestimmung des inhibitorischen Effekts von AID, APOBEC1 und APOBEC2 auf die L1-Retrotranspositionsaktivität.....	86
4	Diskussion	89
4.1	Eine Hypothese zur deaminaseabhängigen Hemmung der L1-Retrotranspositionsrate durch APOBEC3-Proteine mit Hilfe von Faktoren des “ <i>Base Excision Repair</i> “-Weges.....	89
4.2	Die deaminaseunabhängige Hemmung der L1-Aktivität durch APOBEC3C erfolgt über eine Interaktion mit RNA	94
4.3	Hinweise für eine Interaktion zwischen APOBEC3C und LINE-1-RNPs.....	102
4.4	AID, APOBEC1 und APOBEC2 haben keinen hemmenden Effekt auf die L1-Retrotranspositionsrate.....	107
5	Zusammenfassung.....	109
6	Literaturverzeichnis.....	111
7	Anhang.....	127
	Versicherung.....	134
	Danksagung.....	135
	Lebenslauf.....	136

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Die Zusammensetzung des menschlichen Genoms	2
Abb. 2:	Transponierbare Elemente im menschlichen Genom	5
Abb. 3:	Organisation funktioneller humaner LINE-1-Retrotransposons	9
Abb. 4:	Replikationszyklus eines aktiven L1-Retrotransposons	12
Abb. 5:	Ebenen der Regulation der LINE-1-Retrotransposition	17
Abb. 6:	Mitglieder der menschlichen APOBEC-Proteinfamilie	19
Abb. 7:	Menschliche APOBEC3-Proteine schützen die Zellen vor möglichen schädlichen Effekten der Mobilisierung von non-LTR-Retrotransposons	22
Abb. 8:	Die Restriktion von HIV Δ vif durch APOBEC3G	24
Abb. 9:	Ursachen für den Einbau von Uracil in genomische DNA und der Mechanismus der „Base Excision Repair“	25
Abb. 10:	Das L1-Reporterplasmid pJM101/L1 _{RP}	28
Abb. 11:	Das L1-Reporterplasmid pDK101	29
Abb. 12:	Die L1-Protein-Expressionskonstrukte pMini-FLAG-ORF1 und pMini-FLAG-ORF2	29
Abb. 13:	Die APOBEC3-Expressionsplasmide pcA3A-HA.Zeo und pcA3C-HA.Zeo	30
Abb. 14:	Das APOBEC3-Expressionsplasmid pcDNA3.1-APOBEC3C-V5-6xHis	31
Abb. 15:	Die AID-, APOBEC1- und APOBEC2-Expressionsplasmide	31
Abb. 16:	Schematische Darstellung des L1-Retrotranspositionsreporterassays	40
Abb. 17:	Schematischer Aufbau einer Western-Blot-Apparatur	43
Abb. 18:	Graphische Darstellung der Arbeitshypothese: L1-Inhibierung durch APOBEC3-Proteine mittels Editierung der L1-cDNA unter Beteiligung von BER-Enzymen	52
Abb. 19:	Bestimmung der Auftrittswahrscheinlichkeiten der vier L1-kodierten Nukleobasen an der Abbruchstelle 5'-verkürzter <i>de novo</i> -L1-Insertionen	54
Abb. 20:	Bestimmung der Auftrittswahrscheinlichkeit der Nukleobasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin im Bereich der Abbruchstelle genomischer 5'-verkürzter L1-Elemente	56
Abb. 21:	Bestimmung der relativen Auftrittswahrscheinlichkeit der 16 möglichen Dinukleotidkombinationen innerhalb der L1-Sequenzen, welche die Abbruchstelle 5'-verkürzter genomischer L1-Elemente flankieren	58
Abb. 22:	Schematische Übersicht der verwendeten A3C-Mutanten	59
Abb. 23:	APOBEC3C-Mutanten mit inaktiver Deaminasedomäne inhibieren die L1- Retrotransposition	61

Abb. 24:	Übersicht der korrespondierenden A3A- bzw. A3C-Deaminasedomänenmutanten	62
Abb. 25:	A3C-Deaminasedomänenmutanten und ihre korrespondierenden A3A-Mutanten haben gegensätzliche Auswirkungen auf die L1-Retrotranspositionsrate.....	63
Abb. 26:	Effekte der A3C-RNA-Bindetaschenmutanten K22A, R122A und N177A auf die L1-Retrotranspositionsrate	65
Abb. 27:	Auswirkungen der Titration des A3C-R122A-Expressionsplasmids auf die L1-Retrotranspositionsrate.....	67
Abb. 28:	Effekte der A3C-Dimerisierungsmutanten auf die L1- Retrotranspositionsrate.....	69
Abb. 29:	Herstellung von <i>de novo</i> -L1-Insertionen in der Gegenwart von überexprimiertem A3C zur anschließenden Analyse ihrer 3'-Enden.....	71
Abb. 30:	A3C-Überexpression führte zu einer Verringerung der Anzahl an detektierbaren 3'-Enden von <i>de novo</i> L1-Insertionen.....	73
Abb. 31:	Identifizierung von L1-ORF1p und A3C in definierten Fraktionen eines Saccharosegradienten	76
Abb. 32:	Bestimmung der subzellulären Lokalisation von A3C und L1-ORF1p in HeLa- und 143B-Zellen	78
Abb. 33:	Immunoblotanalysen der Immunopräzipitate sprechen gegen eine Interaktion zwischen L1-ORF1p und A3A bzw. A3C.....	81
Abb. 34:	Immunoblotanalysen der Immunopräzipitate liefern keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen A3A bzw. A3C und L1-ORF1p, das von einem funktionellen L1-Element exprimiert wurde	84
Abb. 35:	Immunoblotanalysen von HeLa-Zelllysaten als Nachweis der fehlgeschlagenen Expression von FLAG-L1-ORF2p.....	86
Abb. 36:	Effekte von AID, APOBEC1 und APOBEC2 auf die L1-Retrotranspositionsrate.....	87
Abb. 37:	APOBEC-Proteine bevorzugen bestimmte Dinukleotide als Zielsequenz für die Deaminierung von Cytosinen	95
Abb. 38:	Arbeitshypothese zum dominante-negativen Effekt der A3C-R122A-Mutante auf die Hemmung der L1-Retrotransposition durch A3C-WT	100

Tab. 1:	Übersicht dokumentierter, L1-vermittelter Krankheitsfälle	15
Tab. 2:	Übersicht über die verwendeten APOBEC3-Mutanten.....	30
Tab. 3:	Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	32
Tab. 4:	Übersicht über die verwendeten eukaryotischen Zelllinien.....	37
Tab. 5:	Übersicht der für die Immunoblotanalyse verwendeten Antikörper	44
Tab. 6:	Übersicht der für die Immunofluoreszenz verwendeten Antikörper	47
Tab. 7:	Definitionen statistischer Termini	48

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assiiertes Virus
Abb.	Abbildung
ADAR	„ <i>Adenosine Deamination Acting on RNA</i> “
AID	„ <i>Activation Induced Deaminase</i> “
APE	apurinische/apyrimidinische Endonuklease
APOBEC	„ <i>APOlipoprotein B mRNA-Editing enzyme, catalytic polypeptide</i> “
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bichinoninsäure
BER	„ <i>Base Excision Repair</i> “
cDNA	„ <i>copy DNA</i> “
CMV	Cytomegalievirus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC-H ₂ O	mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DMEM	„ <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	„ <i>Double-Strand Break</i> “
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EN	Endonukleasedomäne
env	„ <i>envelope</i> “
ERV	endogenes Retrovirus
FKS	fötales Kälberserum
FLAG-„tag“	Epitop eines Kapsidproteins des T7-Bakteriophagen
gag	gruppenspezifische Antigene
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HA-„tag“	Epitop des Hämagglutinins des menschlichen Influenzavirus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCoV-229E	menschliches Coronavirus 229E
HERV-K	humanes endogenes Retrovirus der Familie K
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HMMC	„ <i>High Molecular Mass Complexes</i> “
HTLV	humanes T-Zell-Leukämievirus
HYGRO	Hygromycin B

IP	Immunopräzipitation
iPCR	inverse PCR
Kap.	Kapitel
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LINE-1, L1	„ <i>Long Interspersed Nuclear Element 1</i> “
LMMC	„ <i>Low Molecular Mass Complexes</i> “
LTR	„ <i>Long Terminal Repeats</i> “
MBD4	„ <i>Methyl-CpG Binding Domain 4</i> “
MIR	„ <i>Mammalian-wide Interspersed Repeats</i> “
MOI	„ <i>Multiplicity Of Infection</i> “
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “
MVA/T7RP	„ <i>Modified Vaccinia virus Ankara/T7 RNA polymerase hybrid</i> “
MW	Molekulargewicht
NEO	Neomycin-Phosphotransferase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	„ <i>Open Reading Frame</i> “
PBS	„ <i>Phosphate Buffered Saline</i> “
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFV	Primatenfoamyvirus
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	„ <i>RNA interference</i> “
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RT	Reverse Transkriptasedomäne
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFV	„ <i>Simian Foamy Virus</i> “
SINE	„ <i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> “
SINE-R	„ <i>Short Interspersed Nuclear Element of Retroviral origin</i> “
siRNA	„ <i>short interfering RNAs</i> “
SIV _{agm}	„ <i>Simian Immunodeficiency Virus</i> “ von <i>Chlorocebus</i>
SIV _{mac}	„ <i>Simian Immunodeficiency Virus</i> “ von <i>Macaca</i>
SMUG1	„ <i>Single strand specific Monofunctional Uracil DNA Glycosylase</i> “
SRP	„ <i>Signal Recognition Particle</i> “

SVA	„ <i>SINE-R, VNTR and Alu</i> “
T7-„tag“	Epitop eines Kapsidproteins des T7-Bakteriophagen
Tab.	Tabelle
TDG	„ <i>T/U mismatch DNA Glycosylase</i> “
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIR	„ <i>Terminal Inverted Repeats</i> “
TPRT	„ <i>Target-Primed Reverse Transcription</i> “
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	„ <i>transfer RNA</i> “
TSD	„ <i>Target Site Duplication</i> “
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
UNG2	„ <i>Uracil DNA Glycosylase 2</i> “
UTR	untranslatierte Region
V5-„tag“	Epitop des V-Proteins des „ <i>simian virus 5</i> “
VNTR	„ <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> “
WT	Wildtypprotein

Abkürzungen, die nur einmal verwendet wurden, sind an Ort und Stelle erläutert. Aminosäuren und Nukleotide werden im Einbuchstabencode abgekürzt. Gennamen sind kursiv gedruckt. Physikalische, chemische und biologische Größen sowie gängige Abkürzungen der deutschen Sprache sind hier nicht aufgeführt.

1 Einleitung

Frühe Konzepte zur Organisation von Genomen besagten, dass ein Genom im Wesentlichen aus kodierenden Bereichen besteht, die durch nicht kodierende und regulatorische Bereiche voneinander getrennt sind. Spätestens seit der nahezu vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms stellten sich diese Konzepte als nicht zutreffend heraus. In prokaryotischen Zellen ist das Ausmaß des ringförmigen DNA-Moleküls stets proportional zur Anzahl der enthaltenen Gene. Im Gegensatz dazu steht die Anzahl der offenen Leserahmen („**Open Reading Frames**“, ORFs) in eukaryotischen Genomen meist in keinerlei Beziehung zum tatsächlichen DNA-Gehalt. Als Beispiel soll der Vergleich des Genoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit dem menschlichen Genom dienen. Während der Mensch (30.000 – 40.000 Gene) ca. fünfmal so viele Gene wie die Hefe (6.200 Gene) besitzt, ist sein haploides Genom mit 3×10^9 bp etwa 200-mal größer als das von *S. cerevisiae* ($1,4 \times 10^7$ bp; Lander *et al.*, 2001). Dieses Phänomen wird auch als C-Wert-Paradoxon bezeichnet (Thomas, 1971). Als Ursache hierfür wurden repetitive Elemente in den Genomen identifiziert. Neben einer Vielzahl an Mikrosatelliten und Telomersequenzen besteht ein großer Anteil eukaryotischer Genome aus transponierbaren Elementen. Die ersten dieser transponierbaren Elemente wurden von Barbara McClintock im Zuge ihrer Arbeiten an *Zea mays* beschrieben (McClintock, 1950). Sie erhielt für ihre Arbeiten auf diesem Gebiet im Jahre 1983 den Nobelpreis.

Über die Funktion bzw. den Nutzen transponierbarer Elemente für die Wirtszelle wurde viel spekuliert. Ursprünglich sah man in ihnen lediglich „egoistische Gene“ (Dawkins, 1976) oder genomische Parasiten (Yoder *et al.*, 1997). Diese Auffassung änderte sich in den letzten Jahren. Es häuften sich die Indizien, dass transponierbare Elemente neben ihrem Potential, Krankheiten auszulösen, auch einen positiven Effekt auf die Diversität von Genomen haben oder wichtige Funktionen in Zellen übernehmen können (Kazazian, 2004; Goodier und Kazazian, 2008).

1.1 Transponierbare Elemente im menschlichen Genom

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms ergab, dass ca. 46 % auf die Aktivität transponierbarer Elemente zurückzuführen sind (Abb. 1). Im Gegensatz dazu umfassen die Exons funktioneller Wirtsgene nur 0,5 - 1,5 % (Lander *et al.*, 2001).

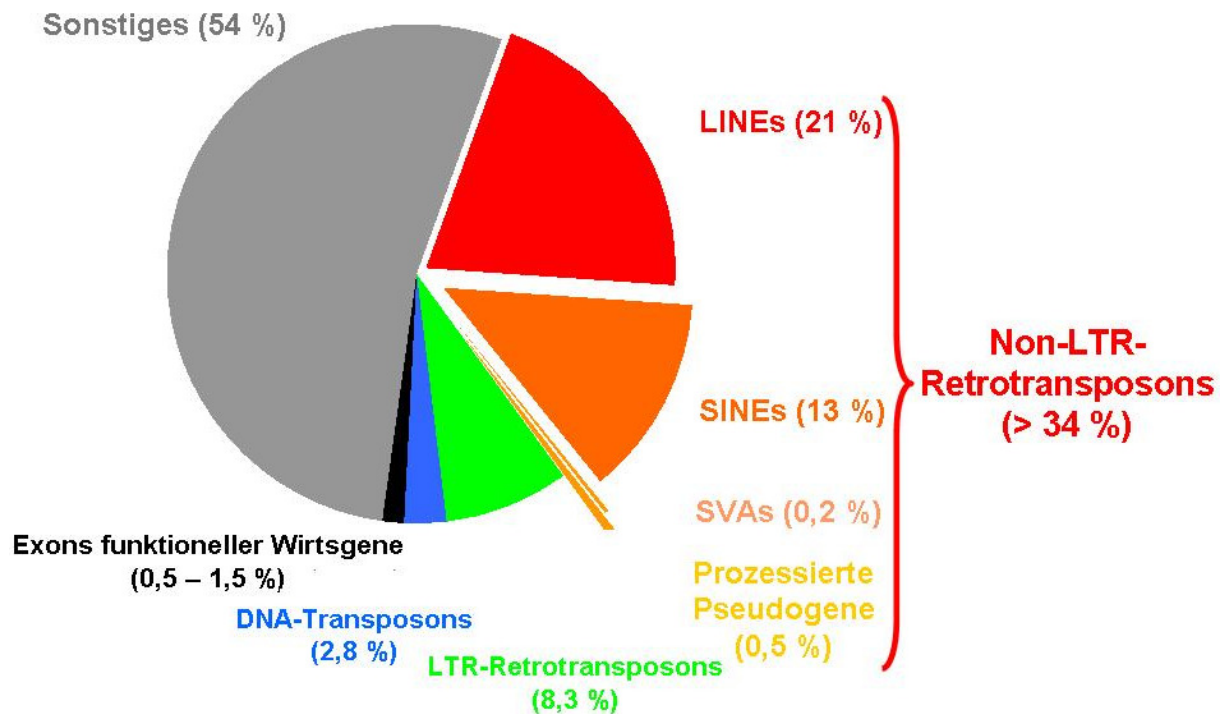


Abbildung 1: Die Zusammensetzung des menschlichen Genoms. 0,5 - 1,5 % des menschlichen Genoms bestehen aus den Exons funktioneller Wirtsgene (schwarz). Dem stehen die transponierbaren Elemente gegenüber, die zusammen mehr als 45 % des Genoms bilden. Zu diesen Elementen zählen DNA-Transposons (2,8 %, blau), LTR-Retrotransposons (8,3 %, grün) sowie non-LTR-Retrotransposons (> 34 %, rot und orange). Die Gruppe der non-LTR-Retrotransposons setzt sich aus LINEs (ca. 21 %), SINEs (ca. 13 %), SVAs (ca. 0,2 %) sowie prozessierten Pseudogenen (ca. 0,5 %) zusammen. Sonstige Sequenzen (ca. 54 %, grau) umfassen Introns, regulatorische Sequenzen, Mikrosatelliten, Telomere etc. (nach Lander *et al.*, 2001; Cordaux und Batzer, 2009).

1.1.1 DNA-Transposons

Die kleinste Gruppe transponierbarer Elemente im menschlichen Genom bilden mit ca. 2,8 % solche Sequenzen, die sich von einst aktiven DNA-Transposons ableiten. DNA-Transposons breiten sich über ein DNA-Intermediat mittels eines „*cut and paste*“-Mechanismus aus. Vollständige und damit autonome Kopien, wie etwa das „*Mariner*“-Element, kodieren die für diesen Vorgang benötigte Transposase. Nicht autonome Kopien besitzen eine Deletion innerhalb des Transposasegens. Alle DNA-Transposons werden von „*Terminal Inverted Repeats*“ (TIRs) flankiert (Abb. 2). Alle 294.000 Elemente dieser Gruppe im menschlichen Genom sind durch Mutationen inaktiviert und stellen genomische Fossilien dar (Lander *et al.*, 2001; Mills *et al.*, 2007; Smit und Riggs, 1996; Babushok und Kazazian, 2007).

1.1.2 Endogene Retroviren

Im Gegensatz zu den DNA-Transposons werden Retrotransposons über ein RNA-Intermediat mittels eines „*copy and paste*“-Mechanismus mobilisiert. Dabei wird das gesamte Element in ein Transkript umgeschrieben, welches anschließend durch eine Reverse

Transkriptase in eine cDNA kopiert wird. Die cDNA-Kopie des ursprünglichen Elements integriert an einer anderen Stelle in das Genom. Durch diesen Mechanismus waren Retrotransposons in der Lage, während der Evolution eine große Anzahl von Kopien im Wirtsgenom zu etablieren.

Für **humane endogene Retroviren** (HERVs, LTR-Retrotransposons), die ca. 8,3 % des menschlichen Genoms umschließen, ist die Flankierung durch lange terminale Wiederholungseinheiten („**Long Terminal Repeats**“, LTRs) charakteristisch (Abb. 2). Die LTRs enthalten den Promotor und es werden drei Regionen mit der Bezeichnung U3, R und U5 unterschieden. In der U3-Region der 5'-LTR sind verschiedene Promotorelemente lokalisiert, während das 5'-Ende der R-Region den Transkriptionsstart definiert. In der 3'-LTR markiert der Übergang von der R-Region, die das Polyadenylierungssignal trägt, zur U5-Region die Polyadenylierungsstelle. Der 7 – 12 kb lange kodierende Bereich endogener Retroviren enthält die Gene *gag*, *pol* und *env*. Das von *gag* (**gruppenspezifische Antigene**) kodierte Protein wird durch eine vom HERV selbst kodierte Protease in die strukturellen Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine prozessiert. Das *pol*-Gen (**Polymerase**) kodiert ein Polyprotein, das ebenfalls durch die viruseigene Protease in die drei Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase gespalten wird. Das *env*-Gen („**envelope**“) kodiert die Proteine der Virushülle. Abhängig vom jeweiligen HERV sind zusätzliche ORFs möglich, die für akzessorische Genprodukte kodieren (Goodier und Kazazian, 2008).

Man geht davon aus, dass HERVs von exogenen Retroviren abstammen, welche die Keimbahn infiziert hatten. Nach der Integration der proviralen DNA in das Genom der Keimzelle wird diese als Teil des Genoms an die folgenden Generationen weitergegeben. Dieser Vorgang wird auch als Endogenisierung bezeichnet. Im Laufe der Evolution wurde die provirale HERV-DNA durch Mutationen so verändert, dass die HERVs als Konsequenz ihre Fähigkeit zur Replikation und Infektion verloren haben. Die humanen endogenen Retroviren wurden innerhalb der letzten 30 Millionen Jahre endogenisiert (Löwer *et al.*, 1996). Die Klassifizierung der 443.000 HERV-Sequenzen erfolgte aufgrund der für die Initiation der reversen Transkription benutzen tRNA (z. B.: Lysin-tRNA bei HERV-K) sowie anhand von Sequenzhomologien zu exogenen Retroviren. Von den ca. 30 verschiedenen HERV-„Familien“ besitzen nur die HERV-K-Elemente noch intakte ORFs für alle Proteine (Löwer *et al.*, 1993; Müller-Lantzsch *et al.*, 1993; Holmes, 2007). Anhand von Polymorphismen wurde festgestellt, dass die jüngsten HERV-K-Insertionen ca. 20.000 Jahre alt sind (Turner *et al.*, 2001). Die Expression von HERV-K-Proteinen konnte in Melanom- und Teratokarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Muster *et al.*, 2003; Dewannieux *et al.*, 2005). Bisher gibt es keine Hinweise auf die Anwesenheit replikationskompetenter HERV-K-Proviren im menschlichen Genom (Mills *et al.*, 2007; Babushok und Kazazian, 2007).

1.1.3 Non-LTR-Retrotransposons

Die einzige Gruppe transponierbarer Elemente, die sich gegenwärtig im menschlichen Genom ausbreitet, umfasst die non-LTR-Retrotransposons, welche sich durch das Fehlen von LTRs auszeichnen und ca. 34 % des Genoms abdecken. Zu dieser Gruppe gehören die autonomen „*Long Interspersed Nuclear Elements*“ (LINEs), die mit ihren ca. 868.000 Kopien pro haploidem Genom ca. 21 % des Genoms abdecken. LINEs werden als autonom bezeichnet, da sie für die Proteinmaschinerie kodieren, die für die Mobilisierung von non-LTR-Retrotransposons verantwortlich ist. Zum anderen gehören hierzu die nicht-autonomen „*Short Interspersed Nuclear Elements*“ (SINEs), die ca. 13 % des Genoms umfassen, SVA-Elemente („*SINE-R*, *VNTR*, *Alu-like region*“) und prozessierte Pseudogene, die ca. 0,2 % bzw. ca. 0,5 % des Genoms abdecken und keine proteinkodierende Kapazität besitzen. Typische strukturelle Merkmale von non-LTR-Retrotransposons sind variable flankierende Zielsequenzverdopplungen mit einer Länge von bis zu 60 bp („*Target Site Duplications*“, TSDs; Szak *et al.*, 2002), ein polyadenyliertes 3'-Ende sowie die genomische Konsensuszielsequenz 5'-TTTT↓A-3'. Der Pfeil deutet die Spaltstelle an. Diese Strukturmerkmale, die allen non-LTR-Retrotransposons gemeinsam sind, beruhen auf einem gemeinsamen Mechanismus der Retrotransposition (Abb. 1.2; Lander *et al.*, 2001; Brouha *et al.*, 2003; Babushok und Kazazian, 2007; Mills *et al.*, 2007; Cordaux und Batzer, 2009).

Die weitaus größte Kopienzahl innerhalb der Gruppe menschlicher transponierbarer Elemente besitzen die SINEs. Trotz ihrer geringen Größe von maximal 300 bp formen die ca. 1.558.000 Kopien 13 % des haploiden menschlichen Genoms. Das mit über 1.000.000 Vertretern häufigste menschliche SINE ist das *Alu*-Element (ca. 10,6 % des Genoms; Cordaux und Batzer, 2009). Es besitzt eine dimere Struktur. Das linke Monomer und das sehr ähnliche rechte Monomer sind durch eine adenosinreiche Sequenz miteinander verbunden (Abb. 2). Beide Monomere des primatenspezifischen *Alu*-Elements entwickelten sich vor über 55 Millionen Jahren aus der 7SL-RNA (Quentin, 1992). Das linke Monomer enthält zwei konservierte Bereiche (A und B), die sich vom RNA-Polymerase III-Promotor (Pol III) der 7SL-RNA ableiten und für die Transkription benötigt werden. Obwohl *Alu*-Elemente keine Proteine kodieren, sind sie aktive Retrotransposons. Die Mobilisierung erfolgt durch die L1-kodierten Proteine *in trans*. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zur 7SL-RNA binden die „*Signal Recognition Particle*“-Proteine (SRP) SRP9p und SRP14p an die *Alu*-RNA und transportieren diese zum Ribosom (Weichenrieder *et al.*, 2000). Am Ribosom interagiert der polyA-Schwanz der *Alu*-RNA mit dem im Entstehen begriffenen L1-ORF2p. Anschließend retrotransponiert das *Alu*-Element mit Hilfe der rekrutierten L1-kodierten Proteinmaschinerie (Boeke, 1997; Dewannieux *et al.*, 2003).

DNA-Transposons



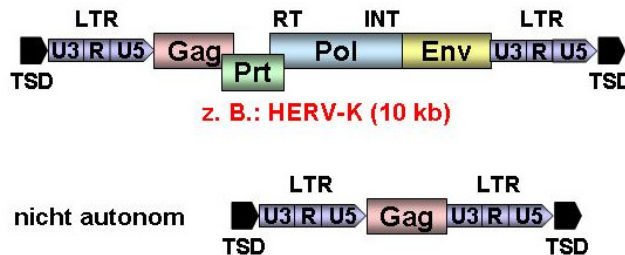
Kopienzahl pro
haploidem Genom

Länge der
vollständigen Kopie

~294.000

1 – 3 kb

LTR-Retrotransposons/Endogene Retroviren



~443.000

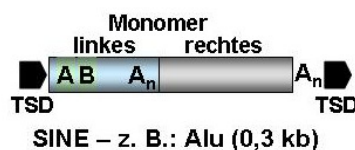
7 – 11 kb

Non-LTR-Retrotransposons



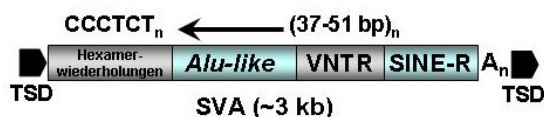
~868.000

6 – 8 kb



~1.558.000

0,1 – 0,3 kb



~3.000

3 kb



~20.000

variabel

Abbildung 2: Transponierbare Elemente im menschlichen Genom. DNA-Transposons sind inaktive Relikte im menschlichen Genom. LTR-Retrotransposons/Endogene Retroviren und LINE-1-Elemente kodieren alle Proteine, die sie für ihre Retrotransposition benötigen, und werden deshalb als autonom bezeichnet (rote Schrift). Nichtautonome Elemente wie SINEs (*Alus*) und SVAs werden durch L1-kodierte Proteine retrotransponiert. Ebenfalls nichtautonome prozessierte Pseudogene entstehen durch die Retrotransposition zellulärer mRNAs, welche durch die L1-Proteine *in trans* vermittelt wird.; DR, direkte Sequenzwiederholungen; TIR, terminale invertierte Wiederholungseinheiten; TSD, Zielsequenzverdopplungen; LTR, lange terminale Wiederholungseinheiten; Gag, gruppenspezifische Antigene; Prt, Protease; Pol, Polymerase; Env, Hüllproteine; UTR, untranslatierte Region; ORF, offener Leserahmen; EN, Endonuklease; RT, reverse Transkriptase; Z, cysteinreiche Region; A_n, Polyadenylierung; A/B, A- und B-Box Pol III-Promotor; VNTR, variable Anzahl von Tandemwiederholungen (adaptiert nach Lander *et al.*, 2001; Deininger und Batzer, 2002; Babushok und Kazanian, 2007; Goodier und Kazanian, 2008).

Dieser SRP-Protein-vermittelte Transport zum Ribosom ist dafür verantwortlich, dass *AluYa5* in zellkulturbasierten Assays 100 – 1.000-fach häufiger mobilisiert wird als zelluläre mRNAs (Dewannieux *et al.*, 2003). Für sechs *AluS*- sowie 22 *AluY*-Unterfamilien konnten Polymorphismen in der menschlichen Bevölkerung nachgewiesen werden (Mills *et al.*, 2007).

Das läßt auf eine Mobilisierung innerhalb der letzten 60 Millionen Jahre schließen (Lander *et al.*, 2001; Häsler *et al.*, 2007). Als krankheitsverursachend und damit tatsächlich aktiv wurden je mindestens ein *Alu*-Element aus den Familien *AluSq*, *AluSz*, *AluYa1*, *AluYa5*, *AluYb3a1*, *AluYb8*, *AluYb9* sowie *AluYc1* identifiziert. Eine zweite Gruppe menschlicher SINEs sind die „**Mammalian-wide Interspersed Repeats**“ (MIRs). Die ca. 390.000 MIR-Kopien umfassen etwa 2 % des menschlichen Genoms. Dieses evolutionär alte SINE ist schon in den Genomen von Beuteltieren nachweisbar und wurde vermutlich durch die Proteinmaschinerie des vor ca. 80 – 100 Millionen Jahren inaktivierten LINE-2-Elements *trans*-mobilisiert (Lander *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *Alu*-Elementen leiten sich MIRs von einer tRNA ab, wobei die spezifische tRNA nicht definitiv ermittelt werden konnte (Smit und Riggs, 1995; Smit, 1999; Babushok und Kazazian, 2007).

Die jüngste und kleinste Familie humaner non-LTR-Retrotransposons bilden die auch gegenwärtig mobilisierten, primatenspezifischen SVA-Elemente. Die etwa 3.000 Kopien retrotransponieren seit ca. 25 Millionen Jahren. SVA-Elemente sind modular aufgebaut (Abb. 2). Das 5'-Ende bildet eine (CCCTCT)_n-Hexamerwiederholung. In 3'-Richtung schließt sich die 355 bp umfassende „*Alu-like*“-Region an. Diese setzt sich aus drei *Alu*-Fragmenten in „*antisense*“-Orientierung sowie einer Sequenz unbekannten Ursprungs zusammen. Darauf folgt eine variable Anzahl an Tandemwiederholungen („**Variable Number of Tandem Repeats**“, VNTR), deren Monomere 36 – 42 bp bzw. 49 – 51 bp lang sind und die dadurch eine Länge von ca. 3.000 bp umspannen kann. Das 3'-Ende bildet ein „**Short Interspersed Nuclear Element of Retroviral origin**“ (SINE-R, Abb. 1.2). Dieses 490 bp lange SINE-R leitet sich vom 3'-Ende des *env*-Genes sowie der 3'-LTR von HERV-K 10 ab (Damert, Raiz *et al.*, 2009). Die SVA-Elemente werden in sechs Unterfamilien unterteilt. Eine Vielzahl von Elementen, die zu den SVA-Unterfamilien D, E und F gehören, sind dimorph in den unterschiedlichen menschlichen Populationen. Die Retrotransposition von Elementen der beiden SVA-Unterfamilien E und F führte zu Erkrankungen (Mills *et al.*, 2007). Die Transkription vieler SVA-Elemente wird von verschiedenen zellulären Promotoren in den 5'-flankierenden Bereichen der SVA-Insertionen gesteuert (Damert, Raiz *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass SVA-Elemente mit Hilfe der L1-Proteinmaschinerie *trans*-mobilisiert werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dies dadurch ermöglicht wird, dass die „*antisense*“-*Alu*-Fragmente der „*Alu-like*“-Region mit *Alu*-RNAs hybridisieren. Dadurch wird der SRP-Protein-vermittelte Transport der SVA-RNA zu den Ribosomen ermöglicht. Anschließend bindet das 3'-Ende der SVA-RNA an L1-ORF2p und wird dadurch *trans*-mobilisiert (Mills *et al.*, 2007).

Die vierte Gruppe humaner non-LTR-Retrotransposons umfaßt die prozessierten Pseudogene. Diese entstehen, wenn zelluläre mRNAs nach ihrer Prozessierung von L1-kodierten Proteinen revers transkribiert und die entstandenen cDNAs ins Genom integriert

werden (Esnault *et al.*, 2000). Daher setzen sich prozessierte Pseudogene ausschließlich aus Exonsequenzen zusammen. Es fehlen ihnen die nicht transkribierten Promotorsequenzen des ursprünglichen Gens, und sie schließen am 3'-Ende mit einem polyA-Schwanz ab. Analysen des menschlichen Genoms zeigten, dass ca. 20.000 prozessierte Pseudogene vorliegen, die ungefähr 0,6 % des Genoms abdecken (Lander *et al.*, 2001; Deininger und Batzer, 2002; Goodier und Kazazian, 2008). Aufgrund des unvollständigen Promotors sowie von Mutationen, die durch das Fehlen eines Selektionsdrucks akkumulieren, sind die meisten prozessierten Pseudogene inaktiv. Nur für die beiden humanen Gene *pgk2* und *pdha2* konnte nachgewiesen werden, dass sie prozessierte Pseudogene sind, die direkt 3'-seitig eines Promotors integrierten und dadurch funktional exprimiert werden (Dewannieux und Heidmann, 2005).

1.1.4 Das humane Non-LTR-Retrotransposon LINE-1

Die autonomen LINE-Elemente (886.000 Kopien) umfassen ca. 21 % des menschlichen Genoms. Die mindestens 175 Millionen Jahre alten LINE-2- (300.000 Kopien, ca. 3 % des Genoms; Lander *et al.*, 2001) und die ca. 200 Millionen Jahre alten LINE-3-Elemente (Kapitonov und Jurka, 2003) stellen inaktive Fossilien dar, die durch Mutations- und Rekombinationsereignisse inaktiviert wurden (Goodier und Kazazian, 2008). Die ca. 500.000 Kopien des non-LTR-Retrotransposons LINE-1 (L1) sind bis zu 160 Millionen Jahre alt und stellen 17 % des gesamten menschlichen Genoms (Deininger und Batzer, 2002; Goodier und Kazazian, 2008). 95 % aller L1-Kopien sind an ihren 5'-Enden verkürzt oder intern rearrangiert und daher inaktiv (Szak *et al.*, 2002). 5.000 - 6.000 L1-Kopien besitzen die volle Länge, jedoch ist auch die Mehrzahl dieser Elemente aufgrund von Mutationen inaktiv. Es liegen ca. 80 bis 100 L1-Elemente im diploiden Genom vor, die sowohl die volle Länge als auch intakte ORFs besitzen und damit retrotranspositionscompetent sind. Da ca. 38 % der retrotranspositionscompetenten L1-Kopien polymorph in der menschlichen Population vorliegen, ist die genaue Anzahl aktiver L1-Elemente von Mensch zu Mensch unterschiedlich (Lander *et al.*, 2001; Brouha *et al.*, 2003). Diese aktiven L1-Kopien gehören zu den evolutionär jüngsten L1-Unterfamilien mit der Bezeichnung L1-PA2, L1-Pre-Ta, L1-Ta-0, L1-Ta-1d und L1-Ta-1nd. Die L1-PA2-Unterfamilie besitzt die ältesten im Menschen aktiven L1-Elemente, deren erste Vertreter vor ca. 65 Millionen entstanden (Brouha *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2007). Die einzelnen L1-Unterfamilien können anhand einzelner, diagnostischer Nukleotide an definierten Positionen voneinander unterschieden werden (Brouha *et al.*, 2003).

Ein vollständiges, zur Retrotransposition befähigtes L1-Element umfaßt ca. 6.000 bp und wird an beiden Enden von TSDs flankiert, die bis zu 60 bp umfassen können (Szak *et al.*,

2002). Diese TSDs sind auf den Mechanismus der L1-vermittelten Retrotransposition zurückzuführen (Kapitel 1.1.2). Am L1-5'-Ende befindet sich eine **untranslatierte Region** (UTR), die im intakten Element 910 bp umfaßt und sowohl einen „sense“- als auch einen „antisense“-Promotor kodiert. Swergold (1990) zeigte, dass die ersten 100 bp der L1-5'-UTR Promotoraktivität besitzen. Im Gegensatz zu anderen DNA-Polymerase II-abhängigen Promotoren besitzt die L1-5'-UTR keine TATA-Box. Die Initiation der Transkription kann am Nukleotid +1 erfolgen (Swergold, 1990; Minakami *et al.*, 1992). In den häufigsten Fällen jedoch beginnt die Transkription des L1-Elements bis zu neun Nukleotide „upstream“ bzw. bis zu drei Nukleotide „downstream“ der Position +1 (Lavie *et al.*, 2004). Bis heute wurden einige der daran beteiligten Transkriptionsfaktoren identifiziert. YY1 bindet an die Nukleotide +13 - +21 und stimuliert oder hemmt die L1-Retrotransposition zelltypabhängig (Minakami *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1993; Athanikar *et al.*, 2004). Eine Bindestelle von RUNX3 liegt bei +83 - +101. Transient exprimiertes RUNX3 resultierte in einer erhöhten L1-Retrotransposition. Eine weitere RUNX3-Bindestelle umfaßt in „antisense“-Orientierung die Nukleotide +508 - +526. Bindet RUNX3 an dieser Position, erhöht sich die Aktivität des „antisense“-Promotors (Yang *et al.*, 2003). Die Sequenzbereiche von +472 - +477 sowie +572 - +577 werden von Proteinen der SRY-Familie gebunden. Während SOX11 allein die L1-Promotoraktivität 9-fach erhöht, resultiert die gleichzeitige Anwesenheit von SOX11 und SRY in einer 3-fachen Aktivierung (Tchenio *et al.*, 2000). Weitere mögliche, L1-regulierende Transkriptionsfaktorbindestellen wurden am äußersten L1-5'-Ende identifiziert. Die entsprechenden Proteine allerdings sind bis jetzt unbekannt (Mathias und Scott, 1993). Die Regulation der L1-Transkription erfolgt auch über CpG-Methylierungen im Bereich der L1-5'-UTR (Thayer *et al.*, 1993; Woodcock *et al.*, 1997). Sowohl das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) als auch die beiden Proteine E2F und Rb binden an methylierte Cytosine in der L1-5'-UTR und verhindern die Transkription des L1-Promotors. Die transkriptionelle Inaktivierung erfolgt wahrscheinlich durch die Interaktion aller drei Proteine mit verschiedenen Histondeacetylasen und der dadurch bedingten Heterochromatinisierung der genomischen DNA (Yu *et al.*, 2001; Montoya-Durango *et al.*, 2009). Einige L1-Elemente zeichnen sich durch eine Deletion der Sequenz von Position +767 - +897 aus. Dieser Dimorphismus scheint keinen Einfluß auf die L1-Aktivität zu besitzen, denn von beiden Formen wurden aktive L1-Elemente beschrieben (Hattori *et al.*, 1985; Dombroski *et al.*, 1991; Brouha *et al.*, 2003).

An die 5-UTR schließt sich der 1.017 bp umfassende ORF1 an (Abb. 3), der für ein Protein mit dem Molekulargewicht 40 kDa (p40, ORF1p) kodiert (Holmes *et al.*, 1992). ORF1p besitzt am N-terminalen Ende eine „coiled-coil“-Domäne (CC), die für die Trimerisierung des Proteins essentiell ist. Außerdem wurden ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM bzw. M) sowie eine konservierte C-terminale Domäne (C) identifiziert, die beide wichtig für die Bindung von

Nukleinsäuren sind (Khazina und Weichenrieder, 2009). L1-ORF1p kann sowohl an DNA als auch an RNA binden (Martin, 2006). Allerdings besteht eine höhere Affinität für einzelsträngige Nukleinsäuren. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass ORF1p essentiell für die Inkorporation des zweiten L1-kodierten Proteins (ORF2p) in die L1-Ribonukleoproteinkomplexe (L1-RNPs) ist oder die L1-RNA vor dem Abbau durch zelluläre RNasen schützt (Martin, 2006). Außerdem wirkt L1-ORF1p auch als Nukleinsäurechaperon (Kulpa und Moran, 2005). Diese Fähigkeit könnte essentiell für die Translation von L1-ORF2p oder für das Schmelzen von Sekundärstrukturen in der L1-RNA bzw. dem Positionieren des DNA-Primers während der reversen Transkription sein (Martin, 2006).

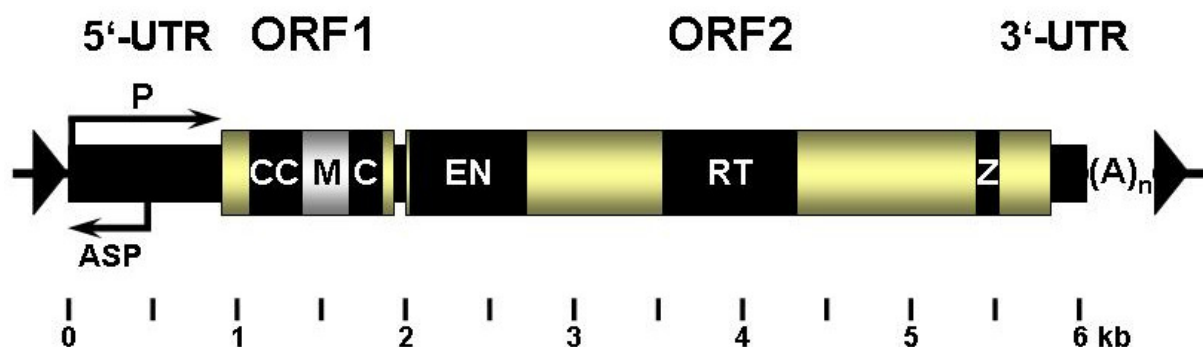


Abbildung 3: Organisation funktioneller humaner LINE-1-Retrotransposons. Es gibt ca. 80 – 100 vollständige und aktive, zur Retrotransposition befähigte L1-Elemente im menschlichen Genom. Schwarze Dreiecke, TSDs; 5'-UTR, 5'-untranslatierte Region; P, „sense“-Promotor; ASP, „antisense“-Promotor; Pfeile geben die jeweilige Transkriptionsrichtung an; ORF1 und ORF2, erster und zweiter offener Leserahmen; CC, „coiled-coil“-Domäne; M, RNA-Erkennungsmotiv; C, konservierte C-terminale Domäne; EN, Endonukleasedomäne; RT, reverse Transkriptasedomäne; Z, cysteinreiche Region; 3'-UTR, 3'-untranslatierte Region; (A)_n, Polyadenylierung am 3'-Ende des L1-Elements (modifiziert nach Babushok und Kazazian, 2007).

ORF2 wird von ORF1 durch eine 63 bp langen, nicht kodierende Region getrennt (Alisch *et al.*, 2006), umfaßt 3.822 bp und kodiert für ein ca. 150 kDa-Polypeptid. Am N-terminalen Ende dieses Proteins befindet sich eine Endonukleasedomäne (EN), die zur Familie der **apurinischen/apyrimidinischen** (AP) Endonukleasen gehört (Feng *et al.*, 1996; Zingler *et al.*, 2005). Die enzymatische Aktivität der EN zeigt eine Spezifität für die Konsensussequenz 5'-TTTT↓A-3'. Die reverse Transkriptasedomäne (RT) hat sowohl RNA- als auch DNA-abhängige Polymeraseaktivität und führt die Erststrangsynthese beim L1-Integrationsvorgang durch (Mathias *et al.*, 1991; Cost *et al.*, 2002; Piskareva und Schmatchenko, 2006). Am C-Terminus des Polypeptids ist eine cysteinreiche Domäne (Z) lokalisiert, die große Ähnlichkeit mit Zinkfinger-Nukleinsäurebindedomänen hat. Es wird vermutet, dass diese Domäne bei der Interaktion von L1-ORF2p mit der genomischen Ziel-DNA eine wesentliche Rolle spielt bzw. als stabilisierender Faktor bei der cDNA-Synthese wirkt (Fanning und Singer, 1987; Ostertag und Kazazian, 2001; Piskareva und Schmatchenko, 2006). Alle drei Domänen des ORF2p sind essentiell für den Vorgang der

L1-Retrotransposition (Moran *et al.*, 1996). Am 3'-Ende von L1 befindet sich eine 205 bp lange untranslatierte Region (3'-UTR), die ein funktionales Polyadenylierungssignal enthält. Jede L1-Kopie endet für gewöhnlich in einem Poly-A-Schwanz mit variabler Länge (Szak *et al.*, 2002).

1.1.5 Expression von L1-Genprodukten

Die Expression der L1-Proteine ist essentiell für den L1-Retrotranspositionsprozess. Sowohl L1-ORF1p als auch L1-ORF2p werden unabhängig voneinander von der bicistronischen L1-mRNA translatiert, denn die Ribosomen dissoziieren von der L1-mRNA, wenn sie das ORF1-STOP-Kodon erreichen. Deshalb besitzt die 63 bp lange, nichtkodierende Region zwischen den beiden ORFs eine wichtige regulatorische Funktion als „*Internal Ribosome Entry Site*“ (IRES), welche die erneute Assemblierung der Ribosomen und damit die Translation von L1-ORF2p ermöglicht (Alisch *et al.*, 2006). In gesundem fötalem Testisgewebe wurden ORF1p und ORF2p in Präspmatogonien, Leydigzellen und Gefäßendothelzellen nachgewiesen. In gesundem adultem Testisgewebe sind beide L1-Proteine in sekundären Spermatozyten, unreifen Spermatozyten, Sertolizellen, Leydigzellen und Gefäßendothelzellen exprimiert. Außerdem waren beide L1-kodierten Proteine im Nebenhoden in Gefäßendothelzellen und Zylinderepithelzellen sowie in der Plazenta in Gefäßendothelzellen und Syncytiotrophoblasten nachweisbar (Ergün *et al.*, 2004). ORF1p wird weiterhin in Hoden- und Eierstocktumoren von Kindern und Erwachsenen (Bratthauer und Fanning, 1992; Bratthauer und Fanning 1993), Medulloblastomen, primären Brusttumorzellen sowie in Brustzelllinien exprimiert (Bratthauer *et al.*, 1994).

Die L1-Retrotransposition in humanen Zellen wurde für verschiedene Tumorzelllinien (Osteosarkom, Gliom, Lungenadenokarzinom, kolorektales Karzinom, Leberkarzinom, Fibrosarkom und Brustadenokarzinom; Rangwala und Kazazian, 2009) sowie für embryonale Stammzellen (Garcia-Perez *et al.*, 2007b; van den Hurk *et al.*, 2007), fötale Hirnstammzellen (Coufal *et al.*, 2009), männliche und weibliche Keimzellen (Georgiou *et al.*, 2009) sowie primäre Fibroblasten und Hepatozyten nachgewiesen (Kubo *et al.*, 2006).

1.1.6 Der Mechanismus der LINE-1-Retrotransposition

Der L1-Replikationszyklus (Abb. 4) beginnt mit der Transkription eines aktiven, zur Retrotransposition befähigten L1-Elements (RC-L1). Die bicistronische L1-mRNA wird in das Zytoplasma exportiert und dort translatiert. Die beiden resultierenden Proteine ORF1p und ORF2p binden aufgrund ihrer *cis*-Präferenz bevorzugt die RNA, von der sie translatiert wurden (Hohjoh und Singer, 1996; Kulpa und Moran, 2006). Die dabei entstehenden L1-

RNPs stellen Intermediate des L1-Retrotranspositionsvorgangs dar, deren genaue stöchiometrische Zusammensetzung ebenso wie die Inkorporation anderer zellulärer Proteine bis heute unbekannt sind (Martin, 1991; Kulpa und Moran, 2005).

Der Mechanismus, über den die L1-RNPs in den Zellkern bzw. zur genomischen Ziel-DNA gelangen, ist unbekannt. Kubo *et al.* (2006) zeigten, dass L1-Retrotransposition auch in differenzierten, sich nicht teilenden Zellen stattfindet. Das spricht für einen aktiven oder passiven Transport der L1-RNPs in den Zellkern. Andererseits wurde kürzlich berichtet, dass L1-Retrotransposition in sich aktiv teilenden, primären, humanen Fibroblasten stattfinden kann (Shi *et al.*, 2006). Die L1-Retrotransposition wurde in solchen Zellen stark inhibiert, die sich in der G1-, S-, G2- und M-Phase der Zellteilung befanden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in sich nicht teilenden Zellen dramatisch verringerte Mengen an L1-RNA vorliegen (Shi *et al.*, 2006).

Luan *et al.* (1993) klärten für das non-LTR-Retrotransposon R2Bm aus *Bombyx mori* den Mechanismus der Minusstrangsynthese auf, welche die Integration des Elements ins Genom einleitet, und faßten diesen im „**Target-Primed Reverse Transcription**“- (TPRT)-Modell zusammen. Die Gültigkeit dieses Modells für das humane L1 wurde von Cost *et al.* (2002) *in vitro* nachgewiesen (Abb. 4B). Die L1-Endonukleasedomäne (L1-EN) schneidet einen Strang der genomischen DNA. Die bevorzugte Zielsequenz für die Integration lautet 5'-TTTT↓A-3' (wobei der Pfeil die Schnittposition markiert). Das Resultat ist eine freie 3'-Hydroxylgruppe (Feng *et al.*, 1996; Cost und Boeke, 1998). Als nächstes bindet die L1-RNA über die polyA-Sequenz an ihrem 3'-Ende mittels komplementärer Basenpaarung an die Thyminsequenzen des teilweise geschmolzenen genomischen DNA-Doppelstranges. Die Reverse Transkriptaseaktivität des L1-ORF2p initiiert die cDNA-Synthese unter Verwendung der freien OH-Gruppe als „*primer*“, wobei die L1-RNA als „*template*“ dient. Das Schneiden des zweiten genomischen DNA-Stranges durch L1-EN generiert vermutlich den „*primer*“ für die Zweitstrangsynthese. Diese Spaltung erfolgt meist 7 – 20 bp „*downstream*“ der ersten Schnittstelle. Daraus resultieren die überhängenden DNA-Enden, die später aufgefüllt werden und die TSDs bilden (Szak *et al.*, 2002). Aufgrund von Mikrohomologien an den 5'-Übergängen 5'-verkürzter L1-Insertionen wurde geschlußfolgert, dass wirtskodierte Faktoren des als „**Non-Homologous End Joining**“ (NHEJ) bezeichneten Reparaturweges an der Verknüpfung des 5'-Endes von L1 mit der genomischen DNA sowie an der Zweitstrangsynthese beteiligt sind (Zingler *et al.*, 2005a).

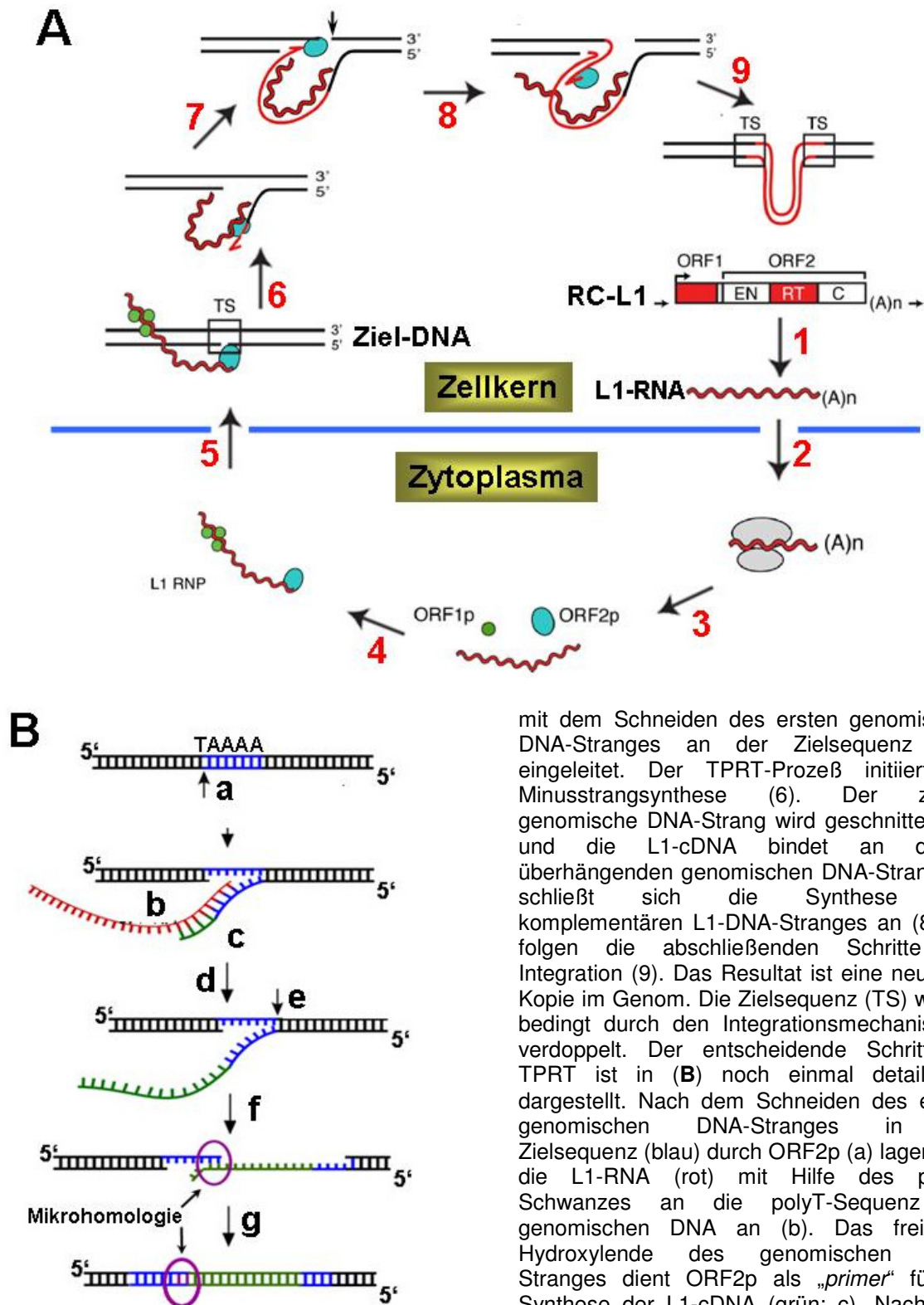


Abbildung 4: Replikationszyklus aktiver L1-Retrotransposons: (A) L1 wird im Genom transkribiert (1). Die resultierende bicistronische mRNA wird in das Zytoplasma exportiert (2). Dort erfolgt die Translation der L1-RNA zu ORF1p und ORF2p (3) sowie der anschließende Zusammenbau von L1-RNPs (4). Funktionelle RNPs werden dann in den Zellkern importiert (5). Dort wird die Integration

mit dem Schneiden des ersten genomischen DNA-Stranges an der Zielsequenz (TS) eingeleitet. Der TPRT-Prozess initiiert die Minusstrangsynthese (6). Der zweite genomische DNA-Strang wird geschnitten (7), und die L1-cDNA bindet an diesen überhängenden genomischen DNA-Strang. Es schließt sich die Synthese des komplementären L1-DNA-Stranges an (8). Es folgen die abschließenden Schritte der Integration (9). Das Resultat ist eine neue L1-Kopie im Genom. Die Zielsequenz (TS) wurde, bedingt durch den Integrationsmechanismus, verdoppelt. Der entscheidende Schritt der TPRT ist in (B) noch einmal detaillierter dargestellt. Nach dem Schneiden des ersten genomischen DNA-Stranges in der Zielsequenz (blau) durch ORF2p (a) lagert sich die L1-RNA (rot) mit Hilfe des polyA-Schwanzes an die polyT-Sequenz der genomischen DNA an (b). Das freie 3'-Hydroxylende des genomischen DNA-Stranges dient ORF2p als „primer“ für die Synthese der L1-cDNA (grün; c). Nach dem Entfernen der L1-RNA (d) und dem Schneiden des zweiten genomischen DNA-Stranges (e) lagert sich die L1-cDNA mittels kurzer homologer Sequenzbereiche (Mikrohominge) an den zweiten genomischen DNA-Strang an (f). Die Zweitstrangsynthese bildet den letzten Schritt der Integration (g; adaptiert nach Cost *et al.*, 2002; Dewannieux und Heidmann, 2005; Zingler *et al.*, 2005a; Beauregard *et al.*, 2008).

Die L1-EN-Aktivität kann eine Schädigung genomischer DNA erreichen, was zu einer Beteiligung zellulärer Reparaturproteine an der L1-Retrotransposition führt. Die als Heterodimer agierenden Proteine ERCC1/XPF, die zum „*nucleotide excision repair*“-Weg gehören, können die L1-Aktivität hemmen (Gasior und Deininger, 2008). Im Gegensatz dazu werden Proteine des „*Double-Strand Break repair*“- (DSB)-Weges für die L1-Retrotransposition benötigt. Dazu gehören die Proteinkinase ATM (Gasior *et al.*, 2006) sowie das DNA-Bindeprotein Ku70, die 5'→3'-Exonuklease Artemis, die DNA-Ligase IV und die katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs; Suzuki *et al.*, 2009).

1.1.7 Der Einfluss von LINE-1-Retrotransposons auf die Organisation und Struktur des Säugergenoms

L1-Elemente wirken vielfältig auf das Genom ein. Retrotranspositionsergebnisse von aktiven L1-Elementen resultieren in Insertionsmutationen (Belancio *et al.*, 2008). Einige Retrotranspositionsergebnisse rufen DNA-Deletionen an der Integrationsstelle hervor. Beispielsweise resultierte die Insertion einer L1-Kopie in der Deletion von 46 kb des *pdxh*-Gens (Gilbert *et al.*, 2002; Symer *et al.*, 2002; Mine *et al.*, 2007). In 10 – 20 % aller Transkriptionsergebnisse wird das schwache L1-Polyadenylierungssignal ignoriert und ein anderes Polyadenylierungssignal in 3'-Richtung benutzt. Dadurch werden 3'-flankierende Sequenzen an den neuen Integrationsort des L1-Retrotransposons übertragen. Dieser Prozeß wird als 3'-Transduktion bezeichnet (Moran *et al.*, 1999; Szak *et al.*, 2002).

Durch ihre große Anzahl begünstigen non-LTR-Retrotransposons homologe Rekombinationen zwischen nichtallelischen Genombereichen. Diese Rekombinationen können Deletionen, Inversionen oder Umgruppierungen innerhalb von Gensequenzen zur Folge haben. Beispielsweise zeigten Han *et al.* (2008), dass seit der Trennung des Menschen vom Schimpansen (*Pan troglodytes*) durch 73 L1-bedingte Rekombinationsergebnisse ca. 450 kb des menschlichen Genoms deletiert wurden.

Den größten Effekt üben non-LTR-Retrotransposons auf die Expression benachbarter Gene aus (Speek, 2001; Nigumann *et al.*, 2002; Mätlik *et al.*, 2006). Durch die L1-vermittelte Retrotranspositionsvorgänge werden im Genom neue Spleißstellen, Polyadenylierungssignale, Promotorsequenzen und Bindestellen für Transkriptionsfaktoren generiert (Goodier und Kazazian, 2008). Findet die Retrotransposition in einem nichtkodierenden Bereich eines Genes statt, kann das zu einem Unterbrechen der Transkription dieses Genes oder zu einer vorzeitigen Transkripttermination aufgrund kryptischer Polyadenylierungssignale innerhalb der L1-Sequenz führen (Perepelitsa-Belancio und Deininger, 2003; Han *et al.*, 2004). Außerdem können Retrotransposonsequenzen durch

einen als Exonisierung bezeichneten Prozeß in die mRNA von Genen inkorporiert werden, wie Meischl *et al.* (2000) am Beispiel eines Patienten mit einem zusätzlichen, von L1-abgeleiteten Intron im *cybb*-Gen zeigten. Während des TPRT-Prozesses ist es außerdem möglich, dass ORF2p auf ein anderes RNA-Molekül wechselt und dadurch chimäre Pseudogene erzeugt. Dieser Vorgang könnte ebenfalls zur Erzeugung neuer Gene beitragen (Buzdin *et al.*, 2007; Garcia-Perez *et al.*, 2007a).

Der L1-„*antisense*“-Promotor in der 5'-UTR ist in der Lage, die Expression von Genen im 5'-flankierenden Bereich der L1-Insertion zu regulieren (Mätlik *et al.*, 2006). Eine direkte Beeinflussung der Chromatinorganisation der DNA aufgrund von L1-Retrotransposition wird ebenfalls vermutet. Die Hypothese besagt, dass eine hohe Dichte an L1-Kopien zur Heterochromatinisierung dieser DNA-Abschnitte führt. Die Expression in der Nähe befindlicher Gene wird dabei ebenfalls verhindert (Whitelaw und Martin, 2001; Allen *et al.* 2002; Cordaux und Batzer, 2009).

Daneben gibt es auch Hinweise darauf, dass LINE-1-Retrotransposons in gewisser Weise auch zelluläre Funktionen übernommen haben. Beispielsweise wird die Beteiligung von LINE-1 an der Inaktivierung von Genen auf dem zweiten X-Chromosom (X-Inaktivierung) diskutiert (Lyon, 2006). Weiterhin zeigten Morrish *et al.* (2002), dass L1-Retrotransposition zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen in genomischer DNA beitragen kann.

L1-Elemente wirken auch auf das Genom ein, indem sie *Alu*-Elemente, SVA-Elemente und prozessierte Pseudogene *trans*-mobilisieren (Dewannieux *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Belancio *et al.*, 2008). Die Aktivierung von *Alu*-Elementen kann ebenfalls in Insertionsmutationen (Belancio *et al.*, 2008) und in Deletionen an der Integrationsstelle resultieren (Callinan *et al.*, 2005). Aufgrund ihrer mehr als 1 Millionen Kopien im haploiden Genom sind *Alu*-Elemente häufig an Rekombinationen zwischen nichtallelischen Genombereichen beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass in den Grenzbereichen menschlicher Segmentduplikationen viele *Alu*-Elemente zu finden sind (Bailey und Eichler, 2006). Der Vergleich der Genome ergab, dass der Mensch seit seiner evolutionären Trennung vom Schimpansen (*Pan troglodytes*) durch Rekombinationen zwischen *Alu*-Elementen ca. 400 kb genomischer Sequenz verloren hat (Xing *et al.*, 2007; Goodier und Kazazian, 2008). Außerdem können *Alu*-Sequenzen durch einen als Exonisierung bezeichneten Prozeß in die mRNA von Genen inkorporiert werden. Schätzungen ergaben, dass 5 % aller alternativ gespleißten menschlichen Exons von *Alu*-Elementen abstammen (Häsler *et al.*, 2007; Sorek, 2007). Zhang und Chasin (2008) zeigten, dass 40 % aller neuen menschlichen Exons alternativ gespleißt werden und 62 % dieser Exons von *Alu*-Elementen abgeleitet sind. Befinden sich zwei *Alu*-Elemente in entgegengesetzter Orientierung zueinander in der 3'-UTR eines Genes, führt das zur Bildung doppelsträngiger RNA im Bereich dieser *Alu*-Elemente. Innerhalb dieser doppelsträngigen mRNA-Bereiche

deaminieren „**Adenosine Deamination Aktung on RNA**“-(ADAR)-Proteine einige Adenosine zu Inosinen. Durch einen unbekannten Mechanismus verbleibt diese editierte mRNA im Zellkern. Auf diese Weise können *Alu*-Elemente die Expression von Genen beeinflussen (Chen *et al.*, 2008). Außerdem postulierten Arcot *et al.* (1995), dass die *Alu*-Retrotransposition eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von Mikrosatelliten innehat.

Tabelle 1: Übersicht dokumentierter, L1-vermittelter Krankheitsfälle (aus Belancio *et al.*, 2008)

Insertion	Locus	Chr	Disease
Alu	3 × F8	X	Hemophilia B
	2 × F9	X	Hemophilia A
	2 × CLCN5	X	Dent's disease
	2 × BTK	X	X-linked agammaglobulinemia
	IL2RG	X	X-linked severe combined immunodeficiency
	GK	X	Glycerol kinase deficiency
	ABCD1	X	Adrenoleukodystrophy
	ATP7A	X	Menkes disease
	CD40LG	X	Hyper-immunoglobulin M syndrome
	CRB1	1	Retinal blinding
	SERPINC1	1	Type 1 antithrombin deficiency
	ZEB2	2	Muckle-Wells syndrome
	MSH2	2	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
	CASR	3	Hypocalciuric hypercalcemia and hyperparathyroidism
	BCHE	3	Cholinesterase deficiency
	HESX1	3	Aplasia anterior pituitary
	MLV12	5	Associated with leukemia
	2 × APC	5	Hereditary desmoid disease
	NTSC3	7	Chronic hemolytic anemia
	2 × CFTR	7	Cystic fibrosis
	EYA1	8	Branchio-oto-renal syndrome
	LPL	8	Lipoprotein lipase deficiency
	CHD7	8	CHARGE syndrome
	POMT1	9	Walker Warburg syndrome
	FAS	10	Autoimmune lymphoproliferative syndrome
	3 × FGFR2	10	Apert syndrome
	SERPINC1	11	Complement deficiency
	HMBS	11	Acute intermittent porphyria
	CMA5	12	Human-specific evolutionary change
	MLV12	12	Mucopolidosis type II
	2 × BRCA2	13	Breast cancer
	BRCA1	17	Breast cancer
	NF1	17	Neurofibromatosis
L1	CHM	X	Choroideremia
	2 × CYBB	X	Chronic granulomatous disease
	4 × DMD	X	X-linked Duchenne muscular dystrophy
	3 × F8	X	Hemophilia A
	2 × F9	X	Hemophilia B
	RP2	X	X-linked retinitis pigmentosa
	RPS6KA3	X	Coffin-Lowry syndrome
	APC	5	Colon cancer
	FKTN	9	Fukuyama-type congenital muscular dystrophy
	HBB	11	Beta-thalassemia
SVA	PDHX	11	Pyruvate dehydrogenase complex deficiency
	BTK	X	X-linked agammaglobulinemia
	LDLRAP1	1	Autosomal recessive hypercholesterolemia
	SPTA1	1	Hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis
	FKTN	9	Fukuyama-type congenital muscular dystrophy

Auch die *trans*-Mobilisierung von SVA-Elementen durch die L1-kodierte Proteinmaschinerie kann in Insertionsmutationen und Deletionen am Insertionsort resultieren (Belancio *et al.*, 2008). Beispielsweise bewirkte die Insertion eines SVAs die Deletion eines vollständigen *hla*-*a*-Gens (Takasu *et al.*, 2007). Für SVA-Elemente wurde außerdem eine große Anzahl an 3'-

Transduktionseignissen beschrieben. Zum Beispiel sind mehrere transkriptionell aktive Kopien des *amac1*-Gens durch eine SVA-3'-Transduktion entstanden (Xing *et al.*, 2006). Bei der 5'-Transduktion wird die Transkription eines SVA-Elements von einem Promotor in der 5'-flankierenden Sequenz initiiert. Die 5'-flankierenden Sequenzen werden an den Ort der Integration übertragen, wodurch auch neue Exons oder Gene entstehen können. Damert *et al.* (2009) identifizierten mehrere Gruppen von SVA-Elementen, die jeweils die gleiche Nukleotidsequenz an ihrem 5'-Ende an einen neuen Ort im Genom transduzierten. Als besonders erfolgreich erwies sich eine Gruppe von 84 SVA-Kopien, die alle an ihrem 5'-Ende einen Teil des ersten Exons des *mast2*-Gens tragen.

Die in den vorangegangenen Kapiteln genannten Einflüsse der L1-Aktivität auf das Genom unterstützten die Evolution der Wirbeltiere im Allgemeinen und die des Menschen im Speziellen. Trotzdem kann die L1-vermittelte Retrotransposition für den individuellen Organismus schädigende Konsequenzen haben und zu Krankheiten führen. Bis heute wurden 65 Krankheitsfälle beschrieben, die auf L1-vermittelte Retrotranspositionseignisse zurückzuführen sind (Tab. 1; Belancio *et al.*, 2008). Um die schädigende Wirkung der L1-vermittelten Retrotransposition zu begrenzen, wurden von der Wirtszelle unterschiedliche Mechanismen zur Hemmung der L1-Aktivität etabliert.

1.1.8 Mechanismen der intrazellulären Verteidigung gegen L1-vermittelte Retrotransposition

Ein zentraler Punkt bei der Kontrolle der L1-Aktivität ist die Regulation der Transkription vollständiger L1-Elemente durch Transkriptionsfaktoren, CpG-Methylierungen der 5'-UTR sowie durch Heterochromatinisierung der genomischen DNA (S. 8; Abb. 5). Die Transkription von aktiven L1-Elementen wird außerdem durch einen unbekannten Mechanismus geregelt, der die effektive transkriptionelle Elongation der L1-RNA nur in wenigen Fällen zulässt, sowie durch vorzeitige Transkripttermination aufgrund kryptischer Polyadenylierungssignale (Perepelitsa-Belancio und Deininger, 2003; Han *et al.*, 2004).

Die L1-Retrotransposition wird außerdem durch „**Short Interfering RNAs**“ (siRNAs) mittels RNA-Interferenz (RNAi; Novina und Sharp, 2004) inhibiert. Die Bildung dieser siRNAs resultiert aus der Aktivität des „*antisense*“-Promotors in der 5'-UTR (Soifer *et al.*, 2005; Yang und Kazazian, 2006). Goodier *et al.* (2007) zeigten, dass sowohl die L1-RNA als auch L1-ORF1p in sogenannten „*stress granules*“ akkumulieren. Deshalb stellt die Sequestrierung von L1-RNA bzw. L1-ORF1p oder der gesamten L1-RNPs einen möglichen alternativen Mechanismus der Regulation der L1-Retrotransposition dar.

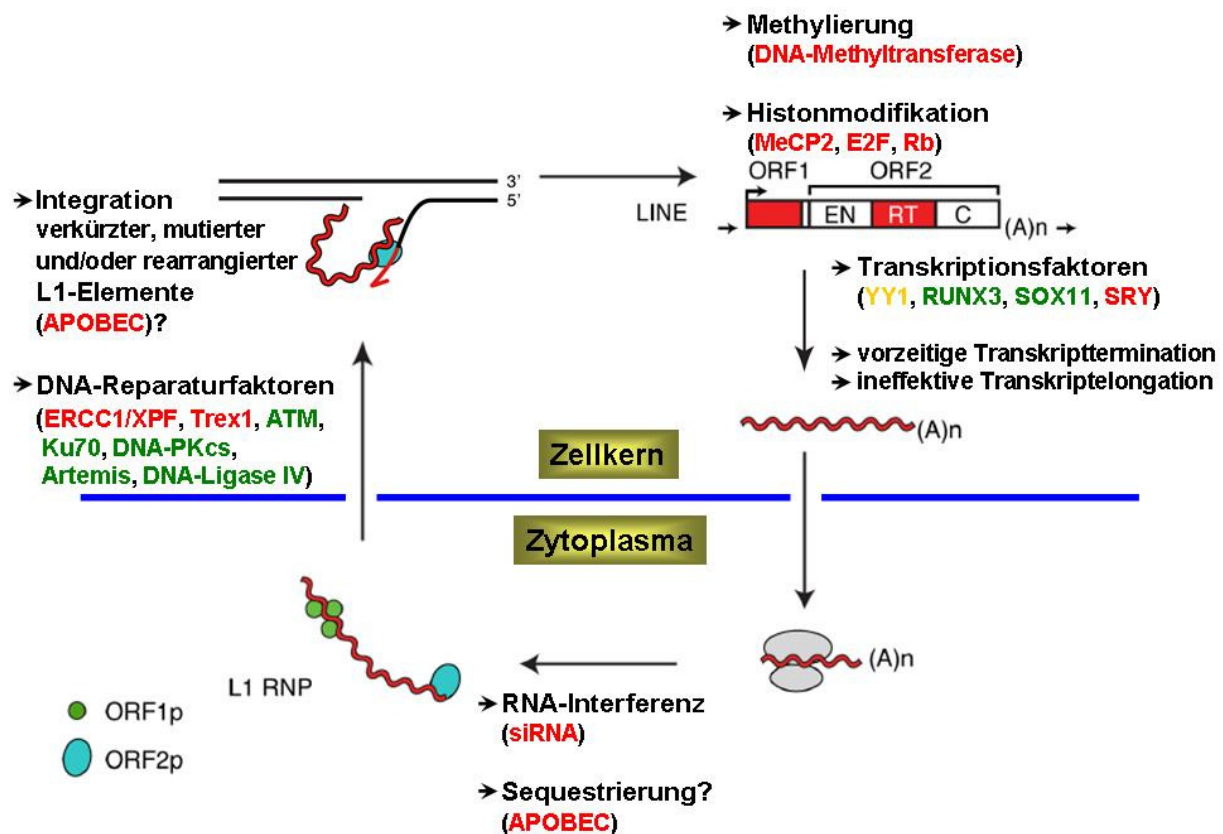


Abbildung 5: Ebenen der Regulation der LINE-1-Retrotransposition. Die Abbildung präsentiert einen vereinfachten L1-Lebenszyklus; L1-hemmende Faktoren (rote Schrift) und L1-aktivierende Faktoren (grüne Schrift) sind angegeben; der Pol II-Transkriptionsfaktor YY1 kann die L1-Transkription sowohl aktivieren als auch hemmen; L1-Expression kann unterdrückt werden durch die CpG-Methylierung der L1-5'-UTR, Heterochromatinisierung durch Histonmodifikationen, ineffektive Transkriptelongation und vorzeitige Polyadenylierung; Transkription vom „sense“- und „antisense“-Promotor erzeugt doppelsträngige RNA, die die L1-Retrotransposition in einem RNAi-Mechanismus hemmt. Die Möglichkeit der Sequestrierung der einzelnen Komponenten von L1-RNPs oder des gesamten L1-RNPs in „stress granules“ wird diskutiert. APOBEC3-Proteine inhibieren die L1-Retrotransposition im Zellkern oder im Zytoplasma über einen bisher unbekannten Mechanismus. Die DNA-Exonuklease Trex1 sowie der DNA-Reparaturkomplex ERCC1/XPF wirken inhibierend während der cDNA-Integration. Der TPRT-Mechanismus führt aus noch nicht eindeutig geklärten Gründen zumeist zu 5'-verkürzten oder invertierten und damit inaktiven L1-Kopien (modifiziert nach Beauregard *et al.*, 2008; Goodier und Kazazian, 2008).

Wirtsfaktoren, die an verschiedenen DNA-Reparaturwegen beteiligt sind, nehmen Einfluß auf die genomische Integration neuer L1-Kopien (S. 13). Während des TPRT-Prozesses können 5'-Verkürzungen, Mutationen oder Rearrangierungen auftreten, die das neu integrierte L1-Element inaktivieren (Goodier und Kazazian, 2008). Die 3'→5'-DNA-Exonuklease Trex1 kann die einzelsträngige L1-cDNA abbauen, wodurch die Integration neuer L1-Kopien in das Genom verhindert wird (Stetson *et al.*, 2008).

Weiterhin wird die L1-Retrotranspositionsrate durch Mitglieder der „**APOlipoprotein B mRNA-Editing enzyme, Catalytic polypeptide**“- (APOBEC)-Proteinfamilie um bis zu 95 % gesenkt, wobei der L1-inhibierende Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist (Chen *et al.*, 2006; Muckenfuss *et al.*, 2006; Stenglein und Harris, 2006; Kinomoto *et al.*, 2007; OhAinle *et al.*, 2008; Macduff *et al.*, 2009).

1.2 Die Familie der APOBEC-Cytidineaminasen

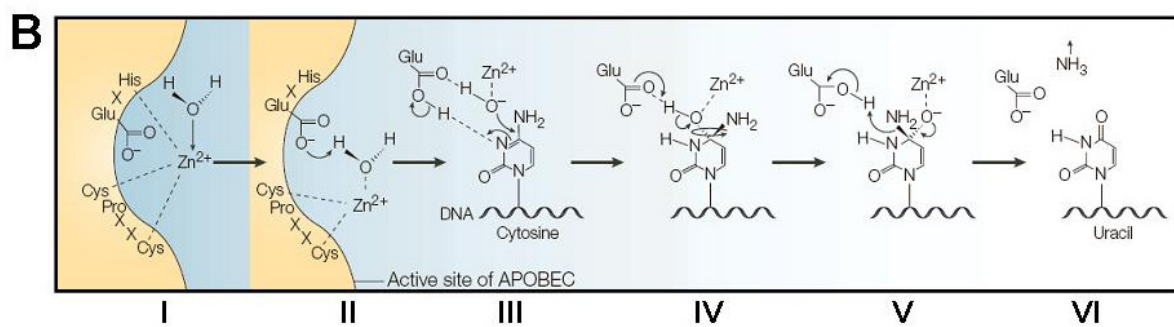
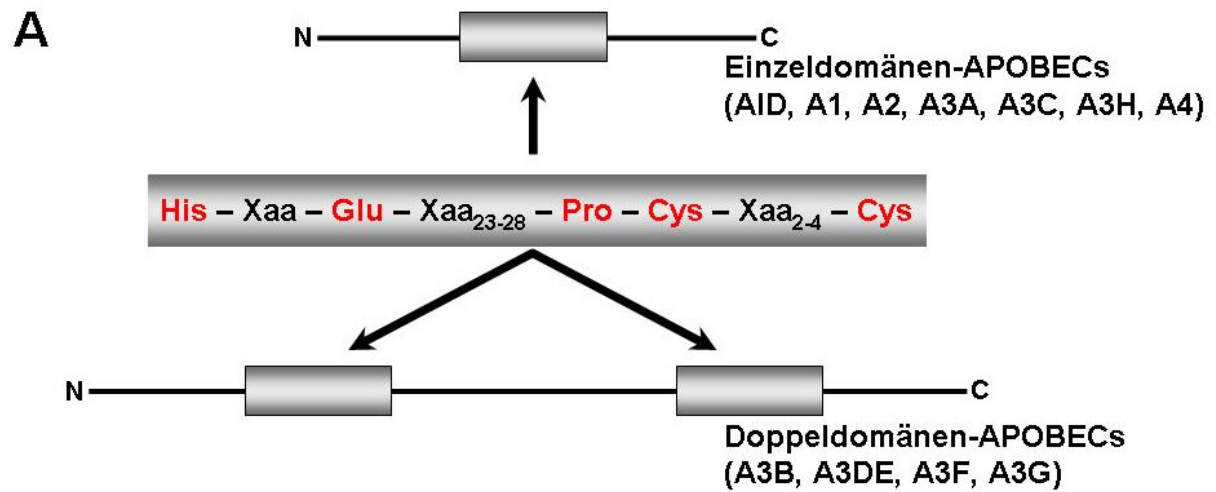
Die Mitglieder der Familie der APOBEC-Proteine zeichnen sich durch das stark konservierte Aminosäuremotiv His – Xaa – Glu – Xaa₂₃₋₂₈ – Pro – Cys – Xaa₂₋₄ – His aus, das eine RNA- bzw. DNA-mutierende Aktivität beinhaltet („RNA-“ bzw. „DNA-editing“). Eine oder zwei Kopien dieser auch als Deaminasedomäne bezeichneten Region liegen in jedem APOBEC-Protein vor. Daher wird auch zwischen Einzel- und Doppeldomänen-APOBEC-Proteinen unterschieden (Abb. 6A). Die biochemische Grundlage der mutagenen Aktivität der APOBEC-Proteine ist die hydrolytische Deaminierung der C4-Position eines Cytosins (Harris und Liddament, 2004; Xie *et al.*, 2004; Abb. 6B).

1.2.1 Die menschlichen APOBEC-Proteine

Das menschliche Genom trägt 11 verschiedene APOBEC-Gene (Abb. 6C). Das namensgebende APOBEC1 (A1) ist auf Chromosom 12 kodiert und wird in gastrointestinalen Geweben exprimiert. Es ist dort Bestandteil eines RNA-Editosomkomplexes, der das Cytidin an Position 6666 der Apolipoprotein B-mRNA deaminiert (Menta *et al.*, 2000). Als Konsequenz wird aus einem Glutamin-Triplett ein STOP-Kodon, wodurch ein verkürztes Protein synthetisiert wird (Teng *et al.*, 1993). Diese kürzere Isoform (apoB48) reguliert die Absorption und den Transport exogener Lipide, während die ursprüngliche Isoform (apoB100) in den Transport endogen produzierter Triglyceride involviert ist. Es wird vermutet, dass A1 die einzige RNA-Deaminase innerhalb der APOBEC-Familie ist (Chiu und Greene, 2008).

Auch die „**Activation Induced Deaminase**“ (AID) ist auf Chromosom 12 kodiert. Sie wird vor allem in B-Zellen exprimiert und ihre DNA-Deaminaseaktivität ist an der Diversifizierung der Immunoglobulingene durch somatische Hypermutationen und „*class switch recombination*“ beteiligt (Muramatsu *et al.*, 1999; Muramatsu *et al.*, 2000). Diese Vorgänge ermöglichen die Evolution der humoralen Immunantwort. Alle AID-abhängigen Prozesse benötigen das zelluläre DNA-Reparaturenzym **Uracil-DNA-Glykosylase** (UNG; Roda *et al.*, 2002).

APOBEC2 (A2) wird auf Chromosom 6 kodiert. Bis heute konnte nicht geklärt werden, welche Funktion dieses Protein besitzt (Harris und Liddament, 2004). Die Funktion des auf Chromosom 1 kodierten APOBEC4 (A4), das vorwiegend in Hodengewebe exprimiert wird, ist ebenfalls unbekannt (Rogozin *et al.*, 2005).



C

APOBEC	Domänenorganisation	zelluläre Lokalisation	L1-Inhibierung in %	intakte Deaminasedomäne für L1-Inhibierung essentiell	G-zu-A-Hypermutationen	
					L1	andere
AID		Z	80	-	nt	nt
A1		NIZ	nt	nt	nt	nt
A2		nt	nt	nt	nt	nt
A3A		NIZ	95	+	-	e, d
A3B		N	80	-	-	a, d
A3C		NIZ	80	nt	-	a, d
A3DE		NIZ	30	nt	nt	d
A3F		Z	80	nt	-	b, c, d
A3G		Z	90	-	-	a, b, c, d
A3H		NIZ	80	nt	nt	e, d
A4		nt	nt	nt	nt	nt

Cytidineaminasedomänen:

nicht klassifiziert

Z1

Z2

Z3

Abbildung 6: Mitglieder der menschlichen APOBEC-Proteinfamilie. Jedes APOBEC-Protein ist charakterisiert durch eine oder zwei Deaminasedomänen. Jede dieser Domänen zeichnet sich durch die konservierte Aminosäuresequenz His – Xaa – Glu – Xaa₂₃₋₂₈ – Pro – Cys – Xaa₂₋₄ – His aus (A). Nach der Anzahl der Deaminasedomänen werden Einzeldomänen-APOBECs (AID, A1, A2, A3A, A3C, A3H und A4) sowie Doppeldomänen-APOBECs (A3B, A3DE, A3F und A3G) unterschieden. (B) Schematische Darstellung der Deaminierungsreaktion. (I) Das Histidin und die beiden Cysteine koordinieren ein Zn²⁺. (II) Ein Wassermolekül reagiert mit dem Zn²⁺ sowie der Glutaminsäure. Dadurch entstehen ein Hydroxid-Ion sowie ein Proton. (III) Anschließend protoniert die Glutaminsäure das N3 des Cytosin-Pyrimidinringes, wodurch die N3-C4-Doppelbindung destabilisiert wird. (IV) Deshalb ist das C4 empfänglich für eine Reaktion mit dem Hydroxid-Ion. Anschließend bildet sich eine tetraedische Zwischenstufe heraus. (V) Darauf folgt die Übertragung eines Protons auf die Aminogruppe in einer Reaktion, die sowohl das Schneiden der C-N-Bindung als auch das Bilden einer C-O-Doppelbindung verursacht. (VI) Das Resultat dieser Reaktion ist die Entstehung von Uracil sowie Ammoniak. (Harris und Liddament, 2004). (C) Schematische Organisation humaner APOBEC-Proteine und ihre Effekte auf die L1-Retrotransposition. APOBEC-Proteine sind entweder im Zytoplasma (Z), im Zellkern (N) oder in beiden Kompartimenten (N/Z) lokalisiert. Während eine intakte Deaminasedomäne für A3A-vermittelte Hemmung von L1 essentiell ist (Muckenfuß *et al.*, 2006), können AID (Macduff *et al.*, 2009), A3B und A3G auch mit inaktivierten Deaminasedomänenmutationen die L1-Aktivität hemmen. In keinem Fall konnten G-zu-A-Hypermutationen in L1-Sequenzen nachgewiesen werden, obwohl alle A3-Proteine zu solchen Mutationen befähigt sind. A3-Proteine verursachen G-zu-A-Mutationen in den LTR-Retrotransposons IAP (a), MusD (b) und Ty1 (c) sowie im Lentivirus HIVΔvif (d) oder in HBV (e). (nach Conticello *et al.*, 2007; Schumann, 2007; Chiu und Green, 2008; OhAinle *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2009; LaRue *et al.*, 2009).

Die Gene, die für die sieben menschlichen APOBEC3-Proteine (A3) kodieren, sind auf Chromosom 22q13.2 tandemartig hintereinander angeordnet (Jarmuz *et al.*, 2002). Da im Genom der Maus nur ein A3-Gen (Chromosom 15) vorliegt, wurde vermutet, dass das A3-Gencluster im menschlichen Genom mittels Genduplikation entstand, nachdem sich die Abstammungslinien von Maus und Mensch voneinander getrennt hatten (Chiu und Greene, 2008). Aus einem ursprünglichen APOBEC-Gen, das für eine AID-ähnliche Deaminasedomäne kodierte, entwickelte sich entweder ein APOBEC3-Gen, das für eine Doppeldomäne kodierte, oder zwei einzelne APOBEC3-Gene, die jeweils für ein Einzeldomänen-A3-Protein kodierten. Die beiden einzelnen Typen von Deaminasedomänen werden als Z1 und Z3 bezeichnet, wobei jede einzelne für sich unabhängig voneinander entstanden ist (Conticello *et al.*, 2005). Aus der Z1-Domäne entwickelte sich ein dritter Typ von Deaminasedomäne, der als Z2 bezeichnet wird. Das murine A3 ist ein Doppeldomänen-APOBEC mit einer Z1- und einer Z3-Domäne. A3H, das nur eine Deaminasedomäne trägt, stellt das einzige humane A3-Protein mit einer Z3-Domäne dar. Alle anderen APOBEC3-Proteine des Menschen zeichnen sich durch jeweils eine oder zwei Z1- bzw. Z2-Domänen aus (Abb. 1.6C; Conticello *et al.*, 2005; LaRue *et al.*, 2009).

Ein weiterer evolutionärer Trend der menschlichen A3-Proteine zeichnet sich in der Erhöhung des antiviralen Potentials durch die Trennung der RNA-Bindung von der Deaminaseaktivität ab (Chiu und Greene, 2008). Es wurde für A3B, A3F und A3G gezeigt, dass die N-terminale Deaminasedomäne für die Bindung an die HIV-RNA sowie das Verpacken in HIV-Partikel verantwortlich ist. Die C-terminale Deaminasedomäne ist für die eigentliche Deaminierung verantwortlich. Ein drittes Indiz für den hohen Evolutionsdruck zur

Ausbildung einer hohen Anzahl verschiedener, aktiver A3-Proteine im Menschen sind die Unterschiede in den Zielsequenzmotiven, die von den Doppeldomänen-APOBEC-Proteinen A3B, A3F und A3G bevorzugt deaminiert werden (Liddament *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2005). Humane A3-Proteine schützen Zellen vor der Ausbreitung von Infektionen mit Lentiviren (**humanes Immundefizienzvirus**, HIV Δ vif) und anderen Retroviren wie dem **humanen T-Zell-Leukämievirus** (HTLV) und dem **Primatenfoamyvirus** (PFV Δ bet) sowie vor der Ausbreitung des **Hepatitis-B-Virus** (HBV) und des **Adeno-assoziierten Virus** (AAV). A3-Proteine sind außerdem entscheidend bei der intrazellulären Verteidigung gegen die für den individuellen Organismus schädlichen Ausbreitung endogener, mobiler genetischer Elemente wie LTR-Retrotransposons (z. B.: IAP, MusD, Ty1) und non-LTR-Retrotransposons (LINE1-1, *Alu*) (Holmes *et al.*, 2007; Schumann, 2007; Chiu und Greene, 2008).

1.2.2 Deaminaseabhängige und -unabhängige Mechanismen der Hemmung von HIV Δ vif durch APOBEC3G

Der Mechanismus der Hemmung der Replikation des Lentivirus HIV Δ vif durch A3G stellt den bisher am gründlichsten untersuchten APOBEC3-vermittelten antiviralen Effekt dar (Abb. 7). Nach der Infektion einer Zelle mit HIV bindet das HIV-kodierte Vif-Protein an A3G und führt es danach dem Abbau im zellulären 26S-Proteasom zu (Marin *et al.*, 2003). Bei Abwesenheit eines funktionellen Vif wird A3G während der Virusassemblierung in das HIV-Partikel inkorporiert (Mariani *et al.*, 2003). Die Inkorporation erfolgt durch die Interaktion von A3G mit dem HIV-Gag-Protein und wird durch die Fähigkeit von A3G, einzelsträngige Nukleinsäuren zu binden, unterstützt (Alce und Popik, 2004; Svarovskaia *et al.*, 2004). Im HIV-Partikel ist A3G an das Nukleokapsid gebunden und wird so in die infizierte Zielzelle übertragen (Soros *et al.*, 2007).

Während des Infektionsvorganges wird die HIV-RNA in das Zytoplasma der Zielzelle eingeschleust und zunächst in eine einzelsträngige virale cDNA revers transkribiert. Währenddessen deaminiert A3G bis zu 10 % aller Cytosine der Minusstrang-cDNA zu Uracilen (Suspene *et al.*, 2004). Diese mutierte Minusstrang-cDNA kann danach mit Hilfe der ebenfalls in HIV-Partikel eingebauten Proteine „**Uracil DNA Glycosylase 2**“ (UNG2) und „**APurinic/APyrimidinic Endonuclease**“ (APE) abgebaut werden (Yang *et al.*, 2007). Es wurden auch Daten veröffentlicht, die dafür sprechen, dass zumindest UNG2 für die Hemmung der HIV Δ vif-Replikation durch A3G nicht notwendig ist (Kaiser und Emermann, 2006). Aber auch ohne die Aktivität der „**Base Excision Repair**“- (BER)-Faktoren wäre die Infektion weiterer Zellen nicht möglich, da aufgrund der Deaminierungen von Cytosinen die

proviralen ORFs mutiert sind und zusätzliche STOP-Codons generiert wurden, so dass keine funktionellen HIV-Proteine synthetisiert werden können (Mangeat *et al.*, 2003).

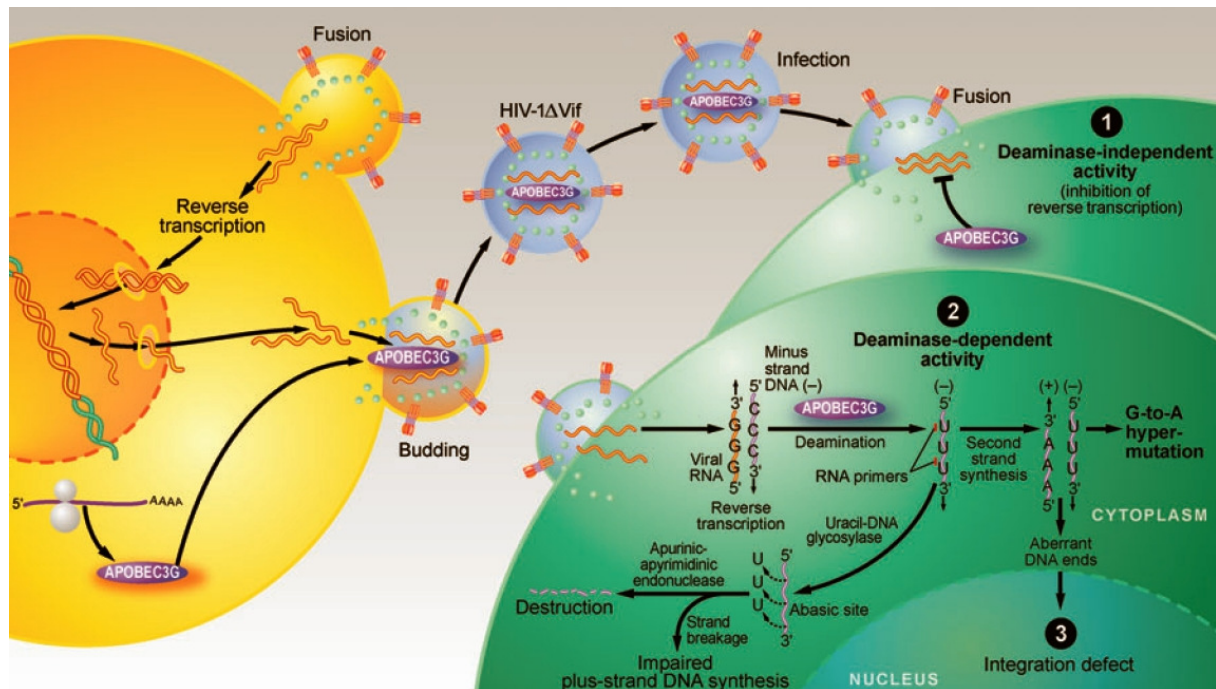


Abbildung 7: Die Restriktion von HIV Δ vif durch APOBEC3G. A3G wird in der Ausgangszelle (gelb) exprimiert, in das HIV-Partikel inkorporiert und dadurch in die Zielzelle (grün) übertragen. Dort hemmt es die HIV Δ vif-Replikation mit Hilfe seiner Deaminaseaktivität. Dies geschieht während der Reversen Transkription der HIV-RNA durch die Deaminierung von Cytosinen der viralen Minusstrang-cDNA. Durch diese G-zu-A-Hypermutationen werden die ORFs mutiert und zusätzliche STOP-Kodons entstehen, wodurch diese Proviren inaktiviert sind. Außerdem ist der Abbau der mutierten Minusstrang-cDNA durch die ebenfalls in HIV-Partikel integrierten Reparaturenzyme UNG2 und APE möglich („Deaminase-dependent activity“, 2). Weiterhin kann A3G HIV Δ vif auch unabhängig von seiner Deaminaseaktivität hemmen. Dies ist einerseits durch die Hemmung der Reversen Transkription („Deaminase-independent activity“, 1) und andererseits durch die Behinderung der Integration von Proviren aufgrund von Interaktionen mit dem Präintegrationskomplex („Integration defect“, 3) möglich. (aus Chiu und Greene, 2008).

Neben dieser deaminaseabhängigen Inhibition existieren auch deaminaseunabhängige Mechanismen der Restriktion der HIV Δ vif-Replikation durch A3G. Bishop *et al.* (2006) zeigten, dass hierfür die Bindung von A3G an die HIV-RNA essentiell ist. Einerseits ist A3G in der Lage, die Initiation der Reversen Transkription durch den tRNA^{Lys3}-Primer zu inhibieren (Guo *et al.*, 2006). Andererseits kann A3G auch mit der HIV-Integrase interagieren, was die Bildung eines funktionellen Präintegrationskomplexes sowie den nukleären Import der HIV-DNA beeinträchtigen könnte. Dadurch wäre die Integration von HIV-Proviren behindert (Luo *et al.*, 2007).

1.2.3 Die Hemmung der LINE-1-Retrotransposition durch APOBEC-Proteine

Die antivirale Aktivität der A3-Proteine wurde erstmal aufgrund ihrer Hemmung der Replikation von Lentiviren (HIV Δ *vif*) entdeckt (Sheehy *et al.*, 2002). Da diese Hemmung über Deaminierung von Cytosinen während der Minusstrangsynthese der reversen Transkription von HIV stattfindet und non-LTR-Retrotransposons, wie das humane L1-Retrotransposon, ebenfalls mittels reverser Transkription replizieren, wurde untersucht, ob humane A3-Proteine auch die L1-Retrotransposition hemmen können. Mit Hilfe von L1-Retrotranspositionsreporterassays konnte die inhibierende Wirkung von APOBEC3- und AID-Proteinen demonstriert werden. Sämtliche Mitglieder der APOBEC3-Familie können die L1-Retrotransposition hemmen (Abb. 6C). APOBEC3A (A3A), APOBEC3DE (A3DE), APOBEC3G (A3G) und APOBEC3H (A3H) hemmen die L1-Aktivität um 95 % (Muckenfuß *et al.*, 2006; Macduff *et al.*, 2009), 30 % (Kinomoto *et al.*, 2007), 90 % (Kinomoto *et al.*, 2007; Macduff *et al.*, 2009) bzw. 80 % (OhAinle *et al.*, 2008). APOBEC3B (A3B), APOBEC3C (A3C) und APOBEC3F (A3F) verringern die L1-Aktivität um 60 – 80 % (Muckenfuß *et al.*, 2006; Stenglein und Harris, 2006). Mutationen in der konservierten Deaminasedomäne von A3A heben dessen inhibierenden Effekt auf (Muckenfuß *et al.*, 2006; Macduff *et al.*, 2009). Auch die Interaktion zwischen A3B und L1 ist abhängig von einer funktionellen Deaminasedomäne (Stenglein und Harris, 2006). Kinomoto *et al.* (2007) und Macduff *et al.* (2009) zeigten, dass APOBEC3G (A3G) die L1-Retrotransposition unabhängig von einer funktionellen Deaminasedomäne um 90 % hemmt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem anderer Gruppen, die weder für A3G noch für A3H einen Effekt auf die L1-Retrotransposition nachweisen konnten (Chen *et al.*, 2006; Muckenfuß *et al.*, 2006). OhAinle *et al.* (2008) fanden eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse im Falle von A3H. Die Autoren konnten nachweisen, dass in der menschlichen Population vier A3H-Allele existieren, von denen nur eines in der Lage ist, die L1-Retrotranspositionsrate um 80 % zu verringern. Auch AID-Expression führte zur Hemmung der L1-Retrotransposition um 80 % (Macduff *et al.*, 2009).

Trotz der nachgewiesenen signifikanten Auswirkungen der A3- und AID-Proteine auf die L1-Aktivität, konnten bisher in keinem Fall G-zu-A-Hypermutationen in genomischen L1-Sequenzen nachgewiesen werden, wie sie für APOBEC-spezifische Cytidineaminaseaktivität typisch sind und für die APOBEC-vermittelte Hemmung der HIV Δ *vif*-Replikation dokumentiert wurden (Muckenfuß *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus der L1-Inhibierung durch APOBEC3-Proteine ist deshalb bisher noch unklar (Abb. 8).

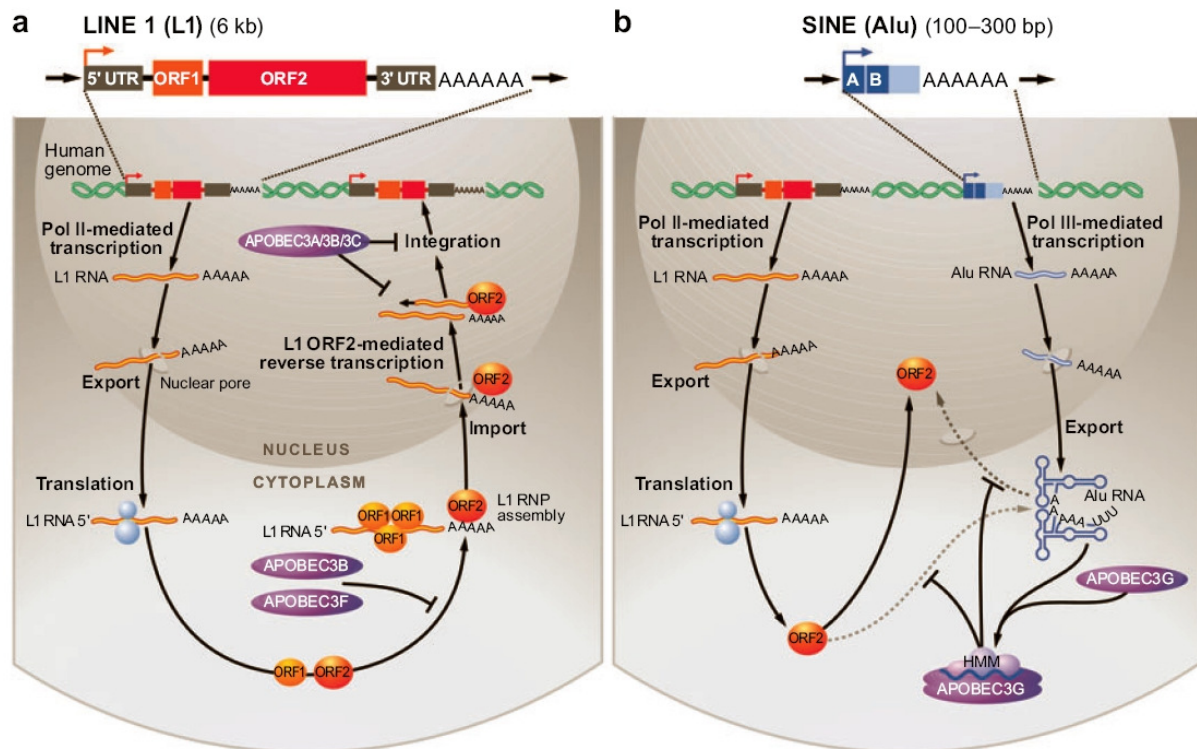


Abbildung 8: Menschliche APOBEC3-Proteine schützen die Zellen vor möglichen schädlichen Effekten der Mobilisierung von non-LTR-Retrotransposons. (a) Die humanen APOBEC3-Proteine A3A, A3B, A3C und A3F inhibieren die L1-Retrotransposition. A3A, A3B und A3C wurden im Zellkern nachgewiesen. Deshalb könnten sie die L1-Aktivität während der reversen Transkription und Integration hemmen. Für A3B und A3F wurden aufgrund ihrer Lokalisation im Zytoplasma Interaktionen mit L1-ORF2p vorgeschlagen. (b) A3G inhibiert die L1-vermittelte *Alu*-Retrotransposition unabhängig von seiner Deaminaseaktivität durch die direkte Interaktion mit der *Alu*-RNA. A3G sequestriert die *Alu*-RNA in zytoplasmatische „*High Molecular Mass Complexes*“ (HMMC) und verhindert dadurch die Interaktion zwischen L1-ORF2p und *Alu*-RNA. (aus Chiu und Greene, 2008).

1.3 „Base Excision Repair“ (BER) und die APOBEC3-vermittelte Inhibition der HIV-Replikation

Deaminierung von Cytosinen durch APOBEC3-Proteine während der reversen Transkription von Retroviren führt zur Entstehung von Uracilen in der entstehenden Minusstrang-cDNA. Das würde zum Einbau falscher Nukleobasen durch DNA-Polymerasen im Plusstrang führen, weshalb die Reparatur solcher DNA-Schäden für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität essentiell ist.

Für das Entfernen von in die genomische DNA fehlerhaft eingebauten Uracilen ist der von der Wirtszelle kodierte Mechanismus der „Base Excision Repair“ verantwortlich. Solche Uracile treten regelmäßig im Genom auf wegen des Falscheinbaus von dUMP durch DNA-Polymerase während der Replikation der genomischen DNA sowie wegen verschiedener Deaminierungs- und Oxidationsreaktionen von Cytosinen (z. B. durch APOBEC3-Proteine) bzw. Thyminen (Visnes *et al.*, 2009; Abb.9A).

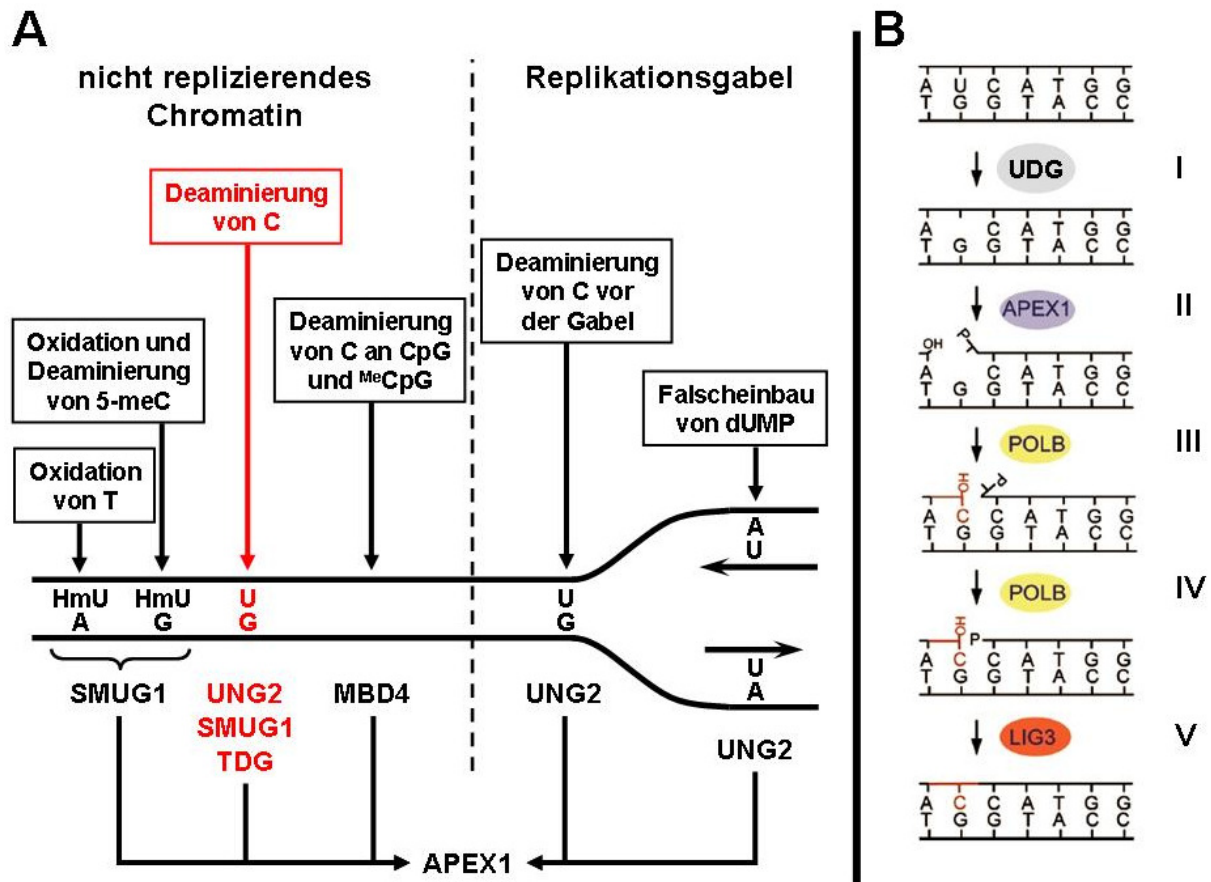


Abbildung 9: Ursachen für den Einbau von Uracil in genomische DNA und der Mechanismus der „Base Excision Repair“. (A). Uracile können in genomischer DNA aufgrund verschiedener Oxidierungs- und Deaminierungsreaktionen in nicht replizierendem Chromatin sowie aufgrund von Deaminierungen und Falscheinbau von dUMP während der Replikation entstehen. Die Uracile werden anschließend spezifisch von einer der vier Uracil-DNA-Glykosylasen (UDG; UNG2, SMUG1, TDG und MBD4) erkannt und die BER wird eingeleitet. (B) „Base Excision Repair“: (I) Die UDG schneidet die N-glykosidische Bindung und entfernt damit das Uracil. (II) Die entstandene AP-Stelle wird von der AP-Endonuklease APEX1 durch das Schneiden des DNA-Phosphat-Zucker-Rückgrates so prozessiert, dass eine Einzelnukleotidlücke entsteht. (III) Diese Lücke wird von der DNA-Polymerase Beta (POLB) mit dem richtigen Nukleotid aufgefüllt. (IV) Es schließt sich das Entfernen der AP-Stelle durch POLB an. (V) Den Abschluss bildet das Schließen der Lücke im DNA-Rückgrat durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung mit Hilfe der DNA-Ligase III (LIG3). (modifiziert nach Robertson *et al.*, 2009; Visnes *et al.*, 2009).

Eine vollständige und erfolgreiche Basenexzisionsreparatur kann durch die enzymatische Aktivität von vier verschiedenen Proteinen in fünf Schritten (Abb. 9B) erfolgen (Kubota *et al.*, 1996): (I) Zunächst erkennt eine **Uracil-DNA-Glykosylase** (UDG) eine fehlerhafte Nukleobase und spaltet die N-glykosidische Bindung. Dadurch wird die beschädigte Nukleobase entfernt und eine „**APurinic/APyrimidinic**“- (AP)-Stelle erzeugt (Lindahl, 1974; Olsen *et al.*, 1989). In der humanen Zelle wird diese Aufgabe in den meisten Fällen von einer der folgenden vier UDGs übernommen. Die wichtigste und häufigste stellt die „**Uracil DNA Glycosylase**“ (UNG) dar und wurde auch als erste identifiziert (Lindahl, 1974). Es existieren zwei verschiedene Isoformen, die durch alternatives Spleißen einer prä-mRNA entstehen. Während UNG1 in Mitochondrien lokalisiert ist, findet man UNG2 im Zellkern (Slupphaug *et al.*, 1993). UNG2 erkennt und prozessiert Uracile sowohl in einzelsträngiger als auch in doppelsträngiger DNA

(Slupphaug *et al.*, 1995). Als Substrat können aber auch andere, von Cytosin abgeleitete Nukleobasen dienen (Dizdaroglu *et al.*, 1996).

Eine weitere wichtige menschliche UDG ist die „**Single strand specific Monofunctional Uracil DNA Glycosylase**“ (SMUG1; Haushalter *et al.*, 1999). Sie erkennt U-G- und U-A-Fehlpaarungen sowie 5-Hydroxymethyluracil sowohl in einzelsträngiger als auch in doppelsträngiger DNA (Boorstein *et al.*, 2001; Barnes und Lindahl, 2004).

Die beiden anderen wichtigen humanen UDGs, „**T/U mismatch DNA Glycosylase**“ (TDG) und „**Methyl-CpG Binding Domain 4**“ (MBD4) erkennen fehlerhaft eingebaute Nukleotide nur in doppelsträngiger DNA. TDG prozessiert Thymin, Uracil sowie Ethenocytosin, die alle mit Guanin basenpaaren (Abu und Waters, 2003; Hardeland *et al.*, 2007). MBD4 erkennt Thymine und Uracile, die gegenüber von Guaninen an CpG-Stellen fehlerhaft eingebaut wurden (Hendrich *et al.*, 1999).

(II) Im zweiten Schritt erkennt die AP-Endonuklease APEX1 diejenige Stelle im genomischen DNA-Strang, an der die Base fehlt („*apurinic/apyrimidinic*“-(AP)-Stelle; Abb. 9B) und schneidet den genomischen DNA-Strang am 5'-Ende der AP-Stelle. Dadurch entsteht ein freies 3'-Hydroxylende sowie ein freies 5'-Phosphatende. Anschließend wird die AP-Stelle prozessiert, so dass eine Einzelnukleotidlücke entsteht (Robson und Hickson, 1991). (III) Als nächstes füllt POLB (DNA-Polymerase β) diese Lücke mit dem korrekten komplementären Nukleotid (Sobol *et al.*, 1996) und (IV) katalysiert dann das Entfernen der Desoxyribose der AP-Stelle (Matsumoto und Kim, 1995). (V) Im letzten Schritt beendet die DNA-Ligase III (LIG3) die BER durch das Schließen der Lücke im DNA-Rückgrat mittels einer Phosphodiesterbindung (Kubota *et al.*, 1996).

1.4 Ziele der Arbeit

Non-LTR-Retrotransposons umfassen ca. 34 % des menschlichen Genoms und repräsentieren die dominierende, aktivste und einflußreichste Gruppe transponierbarer Elemente. Diese „springenden Gene“ verändern das menschliche Genom und verursachen genetische Erkrankungen und Tumoren. LINE-1-Elemente sind die aktivste Familie der non-LTR-Retrotransposons. Sie umfassen gegenwärtig ca. 17 % des menschlichen Genoms. Jeder Mensch trägt ca. 80 – 100 vollständige und aktive L1-Elemente, die zur Retrotransposition befähigt sind. Diese L1-Kopien kodieren für die Proteinmaschinerie, welche die L1-Retrotransposition katalysiert. Die L1-kodierte Proteinmaschinerie formt das humane Genom nicht nur durch die Retrotransposition der L1-Elemente, sondern auch durch die Mobilisierung der nicht-autonomen non-LTR-Retrotransposonfamilien *Alu* und *SVA in trans*, sowie durch die Generierung prozessierter Pseudogene.

Die Familie der humanen APOBEC3-Cytidineaminasen ist eine neue Gruppe von Proteinen, die an der zellulären Verteidigung gegen eine große Anzahl von Retroviren beteiligt ist. Mitglieder der APOBEC3-Proteine inhibieren die Retrotransposition des humanen L1-Elements um bis zu 95 %.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, über welchen Mechanismus bzw. welche Mechanismen APOBEC3-Proteine eine Hemmung der L1-Retrotransposition erreichen. Folgende hypothetische, alternative Mechanismen sollten geprüft werden:

Hypothese 1: Die Editierung der L1-cDNA durch APOBEC3-Proteine findet unter Beteiligung der „*Base Excision Repair*“ statt. Das zu einem Uracil deaminierte Cytosin wird von einer Uracil-DNA-Glykosylase erkannt, welche das Uracil entfernt. Eine AP-Endonuklease schneidet danach die L1-cDNA am 5'-Ende der AP-Stelle. Das resultiert in einer 5'-verkürzten L1-Neuinsertion ohne sichtbare APOBEC3-bedingte Mutation.

Hypothese 2: APOBEC3-Proteine interferieren mit der Aktivität der L1-Proteinmaschinerie. Die APOBEC3-Proteine interagieren mit Komponenten der L1-RNPs, indem sie kompetitiv an die L1-RNA oder die L1-Proteine binden. Mögliche Interaktionen zwischen HA-markierten APOBEC3-Proteinen und der L1-RNA bzw. den L1-kodierten Proteinen sollten untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen weiterer Mitglieder der APOBEC-Proteinfamilie (AID, APOBEC1 und APOBEC2) auf die L1-Retrotransposition zu evaluieren. Hierfür sollte jedes einzelne dieser APOBEC-Proteine in Gegenwart des L1-Retrotranspositionsreporterplasmids exprimiert und die resultierenden Retrotranspositionsraten bestimmt werden. Im Falle der Hemmung der L1-Aktivität sollte auch hier der zugrundeliegende Mechanismus untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide

2.1.1 L1-Expressionsplasmide

- Das L1-Retrotranspositionsreporterplasmid pJM101/L1_{RP}

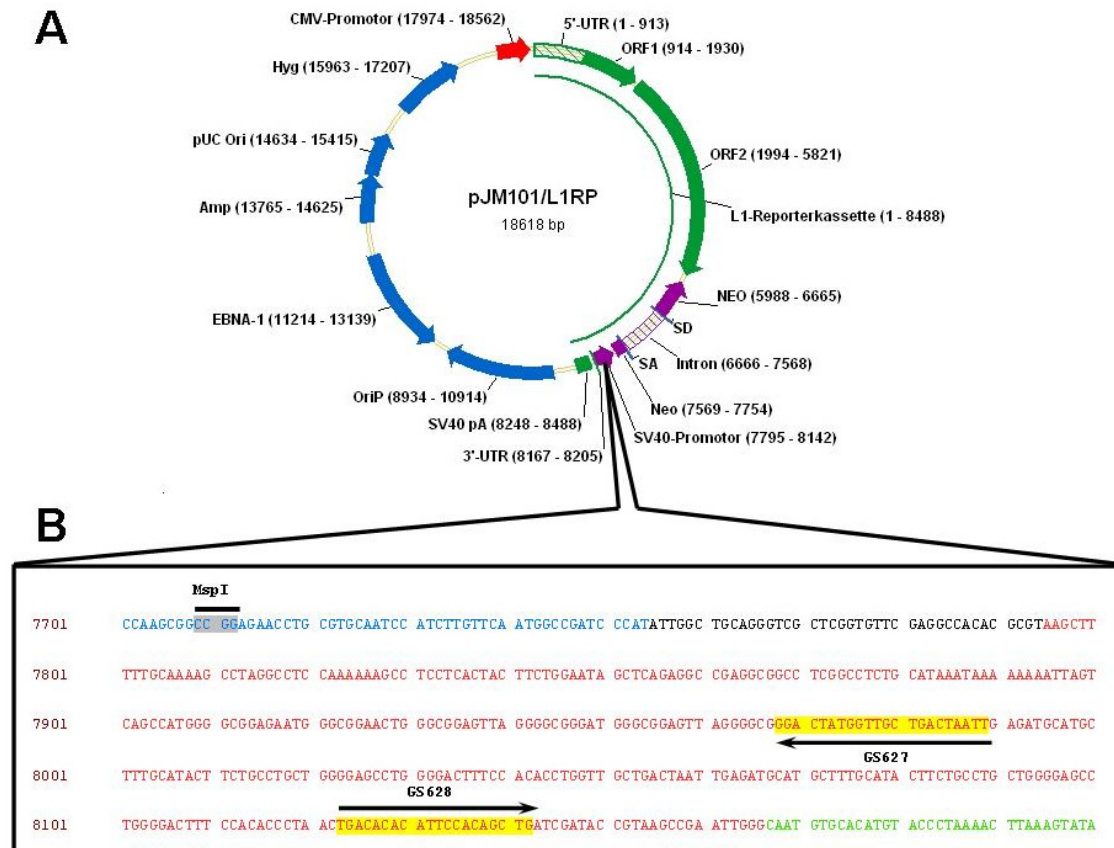


Abbildung 10: Das L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP}. Dieses L1-Expressionsplasmid wurde von John V. Moran (University of Michigan, Ann Arbor) zur Verfügung gestellt. Es wurde erzeugt, indem ein retrotranspositionscompetentes genomisches L1-Element (L1_{RP}) in das episomale Expressionsplasmid pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert wurde (Kimberland *et al.*, 1999). **(A)** Die L1-Reporterkassette steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (rot) und trägt das funktionelle L1_{RP}-Element (grün), in dessen 3'-UTR ein Neomycin-Phosphotransferasegen (NEO, lila) in „antisense“-Orientierung kloniert wurde. Das NEO-Resistenzgen ist durch ein γ -Globin-Intron (Intron) unterbrochen, und seine Expression wird durch einen SV40-Promotor (rot) reguliert. Auf dem episomalen Ausgangsplasmid pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) befinden sich blau markierte Regionen, wie ein bakterielles Resistenzgen (Ampicillin, Amp), ein bakterieller Replikationsursprung (pUC Ori), eine eukaryotisches Resistenzgen (Hygromycin, Hyg) sowie ein episomaler eukaryotischer Replikationsursprung (EBNA-1 und OriP). **(B)** Nukleotidsequenz des 3'-Endes des Neomycin-Phosphotransferasegens (blau) mit der MspI-Schnittstelle, des SV40-Promotors (rot) mit den Binstellen der Primer GS627 und GS628 sowie eines Teils der 3'-UTR (grün).

- Die Negativkontrolle pJM105

pJM105 diente als Negativkontrolle für den Nachweis einer erfolgreichen Geneticinselektion auf *de novo* L1-Retrotranspositionsereignisse (Moran *et al.*, 1996). Das Plasmid unterscheidet sich von pJM101/L1_{RP} darin, dass das aktive L1_{RP}-Element durch das L1.2-Element ersetzt wurde, in dem die RT-Domäne durch eine Punktmutation (D702Y) inaktiviert wurde. Die Konsequenz der Punktmutation ist eine Verringerung der Retrotranspositionsaktivität auf 0,07 %.

- **Das L1-Retrotranspositionsreporterplasmid pDK101**

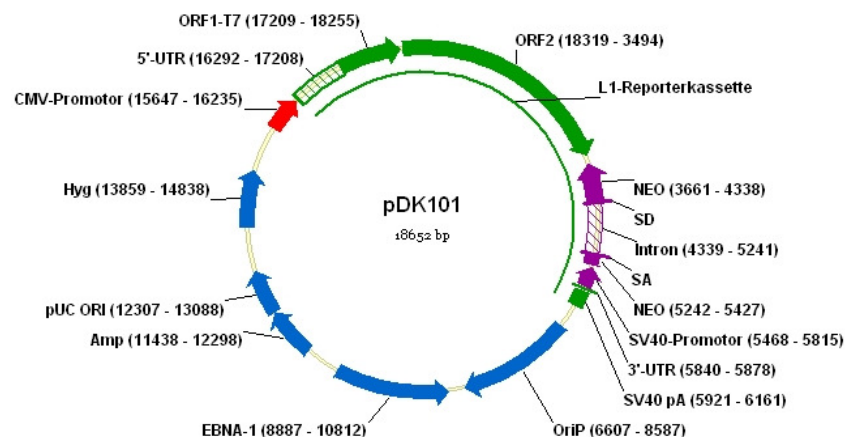


Abbildung 11: Das L1-Reporterplasmid pDK101. Das L1-Expressionsplasmid wurde erzeugt, indem das 3'-Ende des ORF1 des L1.3-Elements mit einer T7-Markierung versehen wurde (Kulpa und Moran, 2005). Dieses L1.3 mit dem markierten ORF1 wurde in das episomale Expressionsplasmid pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. pDK101 wurde von John V. Moran (University of Michigan, Ann Arbor) zur Verfügung gestellt. Die L1-Reporterkassette besteht aus dem retrotranspositionscompetenten L1.3-Element mit den beiden ORFs (ORF1 und ORF2, grün) und dem Neomycin-Phosphotransferasegen (NEO, lila). Das NEO-Resistenzgen ist durch ein γ -Globin-Intron (Intron) unterbrochen. ORF1 trägt eine C-terminale T7-Markierung. Die Transkription der L1-Reporterkassette wird durch einen CMV-Promotor (rot) kontrolliert. Auf dem episomalen Ausgangsplasmid pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) befinden sich blau markierte Regionen, wie ein bakterielles Resistenzgen (Ampicillin, Amp), ein bakterieller Replikationsursprung (pUC Ori), eine eukaryotisches Resistenzgen (Hygromycin, Hyg) sowie ein episomaler eukaryotischer Replikationsursprung (EBNA-1 und OriP).

- **Die Expressionsplasmide pMini-FLAG-ORF1/pMini-FLAG-ORF2**

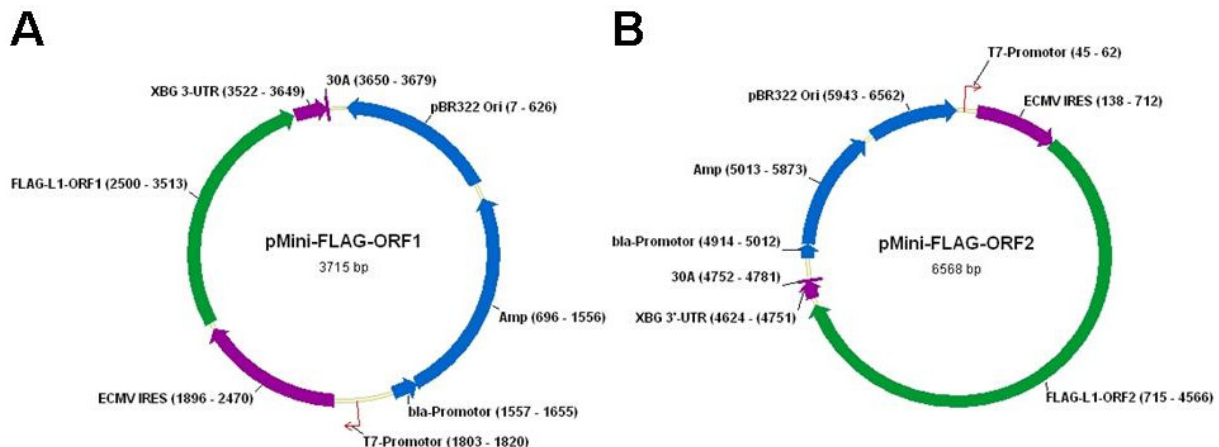


Abbildung 12: Die L1-Protein-Expressionskonstrukte pMini-FLAG-ORF1 und pMini-FLAG-ORF2. pMini-FLAG-ORF1 und pMini-FLAG-ORF2 (Goodier *et al.*, 2004) wurden von John Goodier (University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia) zur Verfügung gestellt. Sie enthalten die ORF1- bzw. ORF2-Sequenz des aktiven L1.2A-Elements, die mittels PCR an ihren 5'-Enden mit einer FLAG-Markierung versehen und anschließend in den MVA/T7RP-abhängigen Expressionsvektor pMini-SC kloniert wurden. (A) Das N-terminal FLAG-markierte ORF1 (grün) steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors (rot). (B) Das ORF2 (grün) wurde N-terminal mit einer FLAG-Markierung versehen. Die Transkription wird durch einen T7-Promotor (rot) kontrolliert. Die „*Internal Ribosomal Entry Site*“ (IRES) des Encephalomyocarditisvirus, die 3'-UTR des β -Globin-Gens aus *Xenopus laevis* sowie ein Block aus 30 Adeninen (30A) gewährleisten eine korrekte Transkription (lila). Die Vektorsequenz (blau) enthält außerdem ein bakterielles Resistenzgen (Ampicillin, Amp) unter der

Kontrolle eines β -Lactamase-Promotors (bla) und einen bakteriellen Replikationsursprung (pBR322 Ori).

2.1.2 APOBEC-Expressionsplasmide

- pcA3A-HA.Zeo und pcA3C-HA.Zeo

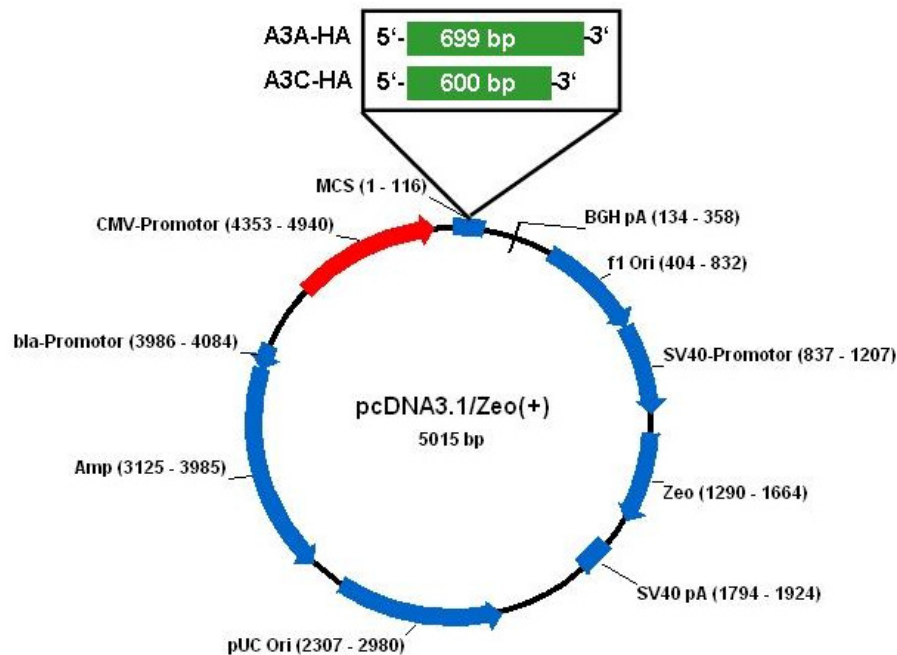


Abbildung 13: Die APOBEC3-Expressionsplasmide pcA3A-HA.Zeo und pcA3C-HA.Zeo. pcA3A-HA.Zeo enthält die Sequenz der humane A3A-cDNA, während pcA3C-HA.Zeo die Sequenz der humanen A3C-cDNA trägt (Muckenfuß *et al.*, 2006). Beide cDNAs erhielten mittels PCR eine HA-Markierung an ihrem 3'-Ende und wurden anschließend in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Die APOBEC3-Expressionsplasmide kodieren für ein c-terminal HA-markiertes APOBEC3 (grün) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (rot). Das pcDNA3.1/Zeo-Plasmidrückgrat (blau) enthält neben einem bakteriellen Resistenzgen (Ampicillin, Amp) und Replikationsursprung (pUC Ori) auch ein eukaryotisches Resistenzgen (Zeocin, Zeo) und einen eukaryotischen Replikationsursprünge (f1 Ori) sowie eine „**M**ultiple **C**loning **S**ite“ (MCS).

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten APOBEC3-Mutanten

APOBEC	Mutante	Art der Mutation	Referenz
A3A	E72A	Deaminasedomäne	Muckenfuß <i>et al.</i> , 2006
	C101A/C106A		
A3C	C97S	Deaminasedomäne	Stauch, Hofmann <i>et al.</i> , 2009
	C100S		
	C97S/C100S		
	E68Q		
	H66R		
	K22A	Nukleinsäure-Bindetasche	
	N177A		
	R122A		
	F55A	Dimerisierungsdomäne	
	W74A		

- **pcDNA3.1-APOBEC3C-V5-6xHis**

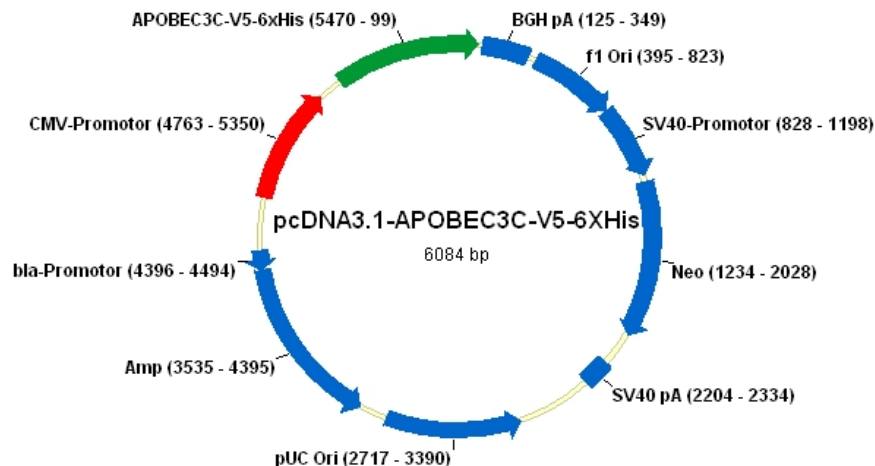


Abbildung 14: Das APOBEC-Expressionsplasmid pcDNA3.1-APOBEC3C-V5-6xHis. Das Plasmid pcDNA3.1-APOBEC3C-V5-6xHis (Aidsreagent; Germantown, USA) enthält ein c-terminal V5- sowie His-markiertes A3C (grün) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (rot). Die pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektorsequenz (blau; Invitrogen, Karlsruhe) besteht aus einem bakteriellen Resistenzgen (Ampicillin, Amp), einem bakteriellen Replikationsursprung (pUC Ori), einem eukaryotischen Resistenzgen (Neomycin, Neo) sowie einem eukaryotischen Replikationsursprung (f1 Ori).

- **pcDNA4-hAID-V5-His, pcDNA4-hA1-V5-His, pcDNA4-hA2-V5-His**

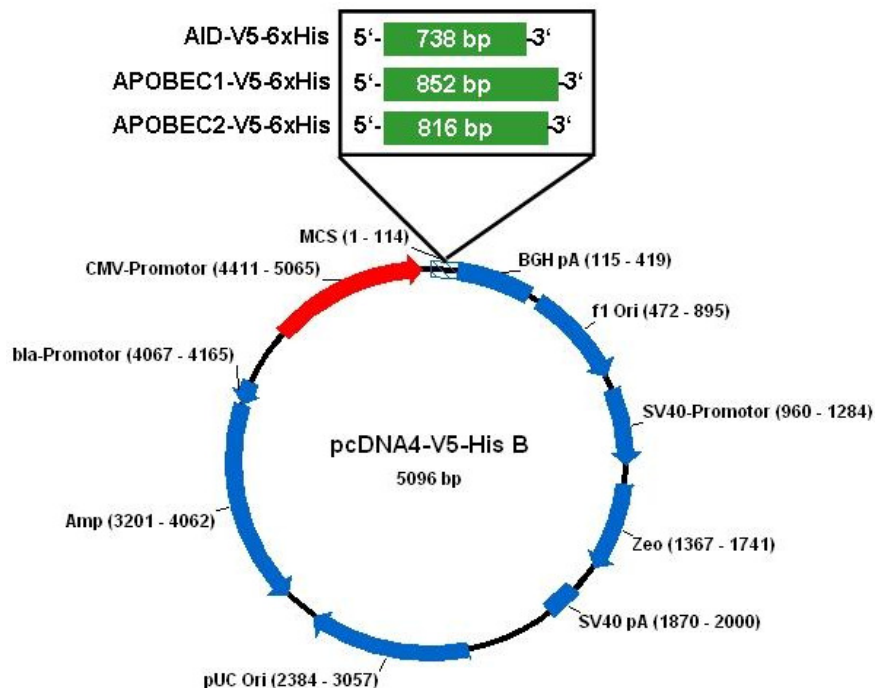


Abbildung 15: Die AID-, APOBEC1- und APOBEC2-Expressionsplasmide. Diese APOBEC-Expressionsplasmide kodieren für ein c-terminal V5- sowie His-markiertes APOBEC (grün; AID, APOBEC1 bzw. APOBEC2), dessen Transkription durch einen CMV-Promotor (rot) kontrolliert wird. Das pcDNA4-V5-His B-Plasmidrückgrat (blau; Invitrogen, Karlsruhe) enthält neben einem bakteriellen Resistenzgen (Ampicillin, Amp) und Replikationsursprung (pUC Ori) auch ein eukaryotisches Resistenzgen (Zeocin, Zeo) und einen eukaryotischen Replikationsursprünge (f1 Ori) sowie eine „Multiple Cloning Site“ (MCS).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
DH5α	F ⁺ ϕ 80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galJ galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

Für die Vermehrung der episomalen L1-Expressionsplasmide wurden *E. coli* DH5α benutzt. Die Propagierung der APOBEC3-Expressionsplasmide erfolgte in *E. coli* TOP10.

2.2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Bakterien wurden in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) oder auf LB-Agar-Platten bei 37 °C kultiviert. Zur Selektion auf erfolgreich transformierte Bakterien wurde das Medium bzw. die Platten mit 100 mg / l Ampicillin versetzt.

Frische Kulturen konnten für ca. einen Monat bei 4 °C gelagert werden. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden 500 µl einer frischen Übernachtskultur mit dem gleichen Volumen an sterilem Glycerin (15 %) gemischt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

LB-Flüssigmedium (1 l):	10 g Trypton/Pepton	Roth (Karlsruhe)
	5 g Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
	10 g Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
LB-Agar:	LB-Flüssigmedium	
	1,5 % Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)

2.2.3 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Um Plasmid-DNA in Bakterien zu transformieren, war eine vorhergehende Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* notwendig. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C sowie 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Bakterien für 15 min bei 3.500 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde in 7,5 ml TSB-Puffer resuspendiert und danach für 1 h bei 4 °C inkubiert. Es schloß sich die Aufteilung der Bakterien in 100 µl-Aliquots sowie das darauf folgende Einfrieren in flüssigem Stickstoff an. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Für die Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 1 x KCM-Puffer und H₂O deion. in einem Endvolumen von 100 µl gemischt und anschließend mit den chemisch kompetenten *E. coli* vermengt. Anschließend wurden die Bakterien für 20 min bei 4 °C und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um dann mit 1 ml SOC-Medium versetzt zu werden, das auf 37 °C vorgewärmt war. Nach einer Kultivierung für 1 h bei 37 °C und 225 rpm folgte das Ausspateln eines Aliquots auf einer LB-Agar-Platte. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide ein β-Lactamasegen besitzen, wurde die LB-Agar-Platte mit 100 µg / ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim) supplementiert. Die Kultur wurde danach über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

TSB-Puffer:	5 %	DMSO	Roth (Karlsruhe)
	10 mM	MgCl ₂	Merck (Darmstadt)
	10 mM	MgSO ₄	Merck (Darmstadt)
	10 %	PEG 6000	Merck (Darmstadt)
	in 2x LB-Medium		
5 x KCM-Puffer:	100 mM	KCl	Roth (Karlsruhe)
	30 mM	CaCl ₂	Merck (Darmstadt)
	50 mM	MgCl ₂	Merck (Darmstadt)
SOC-Medium:	20 g	Trypton/Pepton	Roth (Karlsruhe)
	5 g	Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
	0,5 g	NaCl	Roth (Karlsruhe)
	2,5 mM	KCl	Roth (Karlsruhe)
		pH 7,0; dann autoklavieren	
	20 mM	Glucose	Merck (Darmstadt)
	10 mM	MgCl ₂	Merck (Darmstadt)

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels verschiedener „Kits“ der Firma Qiagen (Hilden; QIAprep® Spin Miniprep Kit, QIAGEN® Plasmid Midi Kit und EndoFree® Plasmid Maxi Kit) mit Hilfe von Ionenaustauschssäulen. Für jeweils eine Mini-, Midi- bzw. Maxipräparation wurden je 4 ml, 50 ml bzw. 200 ml einer frischen Übernachtskultur herangezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das DNA-Pellet wurde in einem angemessenen Volumen H₂O deion. (30 µl bis 300 µl) über Nacht bei 4 °C gelöst. Abschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA. Dafür wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm gemessen (Ultrospec 3100 pro; Amersham Biosciences, Freiburg). Hatte der Quotient A_{260} / A_{280} einen Wert von 1,8, war die Plasmid-DNA rein genug, um in weiteren Experimenten verwendet zu werden.

2.2.5 Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die genomische DNA eukaryotischer Zellen wurde mit Hilfe des „DNAzol® GENOMIC DNA ISOLATION REAGENT“ (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA) isoliert. Es wurden 10⁷ Zellen eingesetzt. Die Präparation erfolgte nach den Angaben im Handbuch des Herstellers. Die Integrität der isolierten genomischen DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.6 PCR-Methoden

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten. Sie setzt sich im Wesentlichen aus drei Abschnitten zusammen. Im ersten werden doppelsträngige DNA-Moleküle bei 94 °C getrennt (Denaturierung). Dies ermöglicht im zweiten Schritt das Anlagern von kurzen Oligonukleotid-„Primern“ bei der entsprechenden Anlagerungstemperatur („Annealing“). Die „Primer“ dienen einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) im dritten Abschnitt als Ausgangspunkt für die Synthese des komplementären Stranges (Elongation). Dieser Schritt findet bei 72 °C statt, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Die Spezifität der Reaktion kann durch die gewählte Annealingtemperatur und Länge der Elongationszeit entscheidend beeinflusst werden.

- **Analytische PCR**

Für die Optimierung der Reaktionsbedingungen neuer „Primer“-Paare sowie zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA wurden 1,5 U AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems; Foster City, Kanada) verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

20 ng	Plasmid-DNA
3 µl	10 x Polymerasepuffer
1,5 mM	MgCl ₂
1,5 U	AmpliTaq® DNA Polymerase
25 pmol	„Primer forward“
25 pmol	„Primer reverse“
0,3 mM	dNTP-Mix
add. 30 µl	H ₂ O deion.

Ablauf eines typischen PCR-Programmes:

Initiale Denaturierung	3 min	94 °C	
Exponentielle Amplifikation			} 35 Zyklen
Denaturierung	30 s	94 °C	
Anlagerung der Primer	30 s	56-68 °C	
Elongation	30-180 s	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	

- **PCR von genomischer PCR**

Für die spezifische Amplifikation von genomischer DNA wurde der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Durch den Zusatz von „Yellow Sub“ (Geneo BioProducts, Hamburg) werden Sekundärstrukturen innerhalb der genomischen DNA aufgelöst, wodurch die Amplifikation unspezifischer Produkte vermieden wird. Außerdem enthält „Yellow Sub“ bereits Glycerin, weshalb bei der Agarose-Gelelektrophorese auf das Hinzufügen des Bromphenolblau-Ladepuffers verzichtet werden konnte. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

200 ng	genomische DNA
5 µl	„10 x High Fidelity PCR Buffer with MgCl ₂ (15 mM)“
5 µl	„Yellow Sub“
1,5 U	„High Fidelity PCR Enzyme Mix“
25 pmol	„Primer forward“
25 pmol	„Primer reverse“
0,8 mM	dNTP-Mix
add. 50 µl	H ₂ O deion.

Der Ablauf des PCR-Programmes entspricht dem einer analytischen PCR.

- **Inverse PCR (IPCR)**

Das in An *et al.* (2006) publizierte Protokoll der inversen PCR wurde modifiziert, um die 3'-Enden von *de novo* L1-Insertionen zu quantifizieren, die aus der Retrotransposition von markierten L1-Reporterelementen resultierten:

1,5 µg genomische DNA wurde in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym *MspI* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) restringiert. Die Prüfung auf eine vollständige Restriktion erfolgte mit Hilfe eines Agarosegeles, in dem 0,5 µg *MspI*-restringierter genomischer DNA elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Es folgte die Zirkularisierung der Restriktionsfragmente in einem Volumen von 1 ml über Nacht bei 16 °C mit 1,6 U / µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main). Am nächsten Tag schloß sich das Einengen des Volumens auf ca. 150 µl mit Hilfe von „*Microcon Ultracel YM-30 Centrifugal Filter Devices*“ (Millipore, Schwalbach/Ts.) an. Die anschließende PCR erfolgte mit Hilfe des „*High Fidelity PCR Enzyme*“-Mixes von Fermentas (St. Leon-Rot) mit diesem Ansatz:

12 µl	Ligationsansatz
5 µl	„10 x High Fidelity PCR Buffer with MgCl ₂ (15 mM)“
5 µl	„Yellow Sub“
1,5 U	„High Fidelity PCR Enzyme Mix“
25 pmol	„Primer forward“
25 pmol	„Primer reverse“
0,8 mM	dNTP-Mix
add. 50 µl	H ₂ O deion.

Die PCR-Reaktion folgte diesem Schema:

Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	
Exponentielle Amplifikation:			} 19 Zyklen
Denaturierung	15 s	94 °C	
Anlagerung der Primer	30 s	65 °C (- 0,5 °C je Zyklus)	
Elongation	90 s	72 °C	
Exponentielle Amplifikation:			} 21 Zyklen
Denaturierung	15 s	94 °C	
Anlagerung der Primer	30 s	60 °C	
Elongation	90 s	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung der DNA entsprechend ihrer Molekülgröße und dreidimensionalen Struktur. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Dabei gilt, je kleiner ein Fragment ist, desto

schneller wandert es im Agarosegel. Abhängig von den aufzutrennenden Fragmentgrößen wurden 1 - 3 %ige Agarosegele für die Auftrennung hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 3 bis 9 V / cm² in 1 x TAE-Puffer. Danach wurde das Agarosegel für 4 min in einem Färbebad mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid gefärbt sowie anschließend für 30 min in 1 x TAE entfärbt. Dabei interkalierte das Ethidiumbromid in die DNA und fluoreszierte nach Anregung durch UV-Licht (λ = 312 nm). Dadurch wurden die Nukleinsäuren sichtbar. Zur Größenbestimmung wurde ein Größenmarker in Form einer DNA-Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen.

50 x TAE-Puffer :	2 M	Tris, pH 8,0	Roth (Karlsruhe)
	0,025 M	EDTA	Merck (Darmstadt)
	5,71 %	Essigsäure	Roth (Karlsruhe)

2.3 Zellkulturmethoden

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	Referenz
HeLa	Zervixkarzinom	ATCC-Nummer: CCL-2; Gey <i>et al.</i> , 1952
143B	Osteosarkom	ATCC-Nummer : CRL-8303 ; Campione-Piccardo <i>et al.</i> , 1979
2102EP	Teratokarzinom	Wang <i>et al.</i> , 1980

Alle humanen Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Inkubator C200; Labotect, Göttingen) bei 37 °C mit 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % kultiviert.

Die Kultivierung von HeLa erfolgte in „*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*“ (DMEM; Biochrom, Berlin), das mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS; Biowest, Nuaille, Frankreich), 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin) und 20 U / ml Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL, Grand Island NY, USA) supplementiert wurde. Die Zellen konnten zweimal wöchentlich passagiert werden. Die Verdünnungsrate lag bei 1 : 5.

Für die Kultivierung von 143B-Zellen wurde DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 20 U / ml Penicillin / Streptomycin und 1 mM nichtessentiellen Aminosäuren (NEA; Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Bei einer Verdünnungsrate von 1 : 5 konnten die 143B-Zellen zweimal wöchentlich passagiert werden.

2102EP-Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem FKS, 2 mM L-Glutamin und 20 U / ml Penicillin / Streptomycin kultiviert. Die Passagierung erfolgte zweimal wöchentlich mit einer Verdünnungsrate von 1 : 3.

2.3.2 Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen

Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen T75-Zellkulturflasche (80 cm² Fläche; Nunc, Langenselbold) mit 2 ml Trypsinlösung vom Flaschenboden gelöst und auf zwei 15 ml-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-One, Frickenhausen; ca. 3×10^7 Zellen / Reaktionsgefäß) aufgeteilt. Der Pelletierung der Zellen bei 500 rpm für 5 min schloss sich die Resuspendierung des Pellets in 1 ml Einfriermedium an. Abschließend wurde die Zellsuspension bei -80 °C in einem Isopropanolbad eingefroren (Kühlrate: 1 °C / min) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Trypsinlösung :	10 ml Trypsin (2,5 %)	PEI
	10 ml Versen (1:1000)	PEI
	80 ml PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Biochrom (Berlin)
Versen-Lösung:	159 mM NaCl	Roth (Karlsruhe)
	2,7 mM KCl	Roth (Karlsruhe)
	6,5 mM Na ₂ HPO ₄	Roth (Karlsruhe)
	1,5 mM KH ₂ PO ₄	Roth (Karlsruhe)
	2,7 mM EDTA	Merck (Darmstadt)
1 x PBS :	137 mM NaCl	Roth (Karlsruhe)
	2,7 mM KCl	Roth (Karlsruhe)
	4,3 mM Na ₂ HPO ₄	Roth (Karlsruhe)
	1,4 mM KH ₂ PO ₄	Roth (Karlsruhe)
Einfriermedium :	10 % DMSO	Roth (Karlsruhe)
	20 % FKS	Biowest (Nuaille, Frankreich)
	70 % Zellkulturmedium	

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die auf der Zellkulturschale oder in der Zellkulturflasche anheftenden Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Es folgte das Abstoppen der Trypsinierung durch die Zugabe von 25 ml Zellkulturmedium. Es schloss sich die Bestimmung der Zellzahl mittels eines 30 µl-Aliquots in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen) an.

2.3.4 L1-Retrotranspositionsreporterassay

Der L1-Retrotranspositionsreporterassay wurde in der Arbeitsgruppe von Haig Kazazian (University of Pennsylvania) entwickelt (Moran *et al.*, 1996). Die in dieser Arbeit verwendete Variante dieses Assays basiert auf dem Protokoll beschrieben in Wei *et al.* (2000). Jeder Ansatz wurde mindestens als Triplikat durchgeführt. Der Assay basiert auf dem Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} (S. 28), welches das aktive L1_{RP}-Element trägt (Kimberland *et al.*, 1999). In die 3'-UTR dieses L1 ist ein Neomycin-Phosphotransferasegen in „*antisense*“-Orientierung inseriert. Das Neomycin-Phosphotransferasegen ist seinerseits durch ein γ -Globin-Intron in „*sense*“-Orientierung unterbrochen (Abb. 10, S. 28). Erst nach der Transkription der L1-Reporterkassette, dem Entfernen des γ -Globin-Introns durch „*splicing*“, der Reversen Transkription und der Integration in das Genom exprimiert die Zelle ein aktives Neomycinresistenzgen (Abb. 16). Daher stellt jede geneticinresistente HeLa-Kolonie einen Zellklon dar, der sich durch mindestens ein *de novo* L1_{RP}-Retrotranspositionseignis auszeichnet.

Für einen L1-Retrotranspositionsreporterassay wurden 3×10^5 HeLa-Zellen in eine Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Transfektion mit insgesamt 1 μ g Plasmid-DNA und 3 μ l FUGENE6-Transfektionsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers. 24 Stunden später wurde die Selektion auf Retrotranspositionseignisse eingeleitet. Hierfür wurde das bisherige Zellkulturmedium durch DMEM ersetzt, dem 0,4 mg / ml Geneticin (Gibco BRL, Grand Island NY, USA) zugesetzt waren. Um den Zeitpunkt des erfolgreichen Abschlusses der Geneticinselektion zu identifizieren, wurden 3×10^5 nicht-transfizierte HeLa-Zellen der gleichen Selektionsprozedur mit geneticinhaltigem Medium unterzogen. Sobald hier keine Zellen mehr am Boden der 6-Lochplatte anhefteten, galt die Selektionsprozedur als abgeschlossen. Es folgte das Fixieren und Färben der nach Geneticinselektion entstandenen Kolonien durch Zugabe von 200 μ l Giemsa-Färbelösung (Merck, Darmstadt) je Vertiefung einer 6-Lochplatte. Den Abschluss bildete das Zählen der Kolonien mit Hilfe eines selbst gefertigten Zählrasters.

2.3.5 Expression von L1-kodierten Proteinen mittels eines rekombinanten Vacciniavirus

Die Expression L1-kodierter Proteine wurde durch das „*Modified Vaccinia virus Ankara/T7 RNA Polymerase hybrid*“- (MVA/T7RP)-Expressionssystem ermöglicht. Zum MVA/T7RP-System gehört ein rekombinantes MVA, das zusätzlich das Gen für die RNA-Polymerase des T7-Phagen enthält und dadurch die Expression von unter der Kontrolle des T7-Promotors

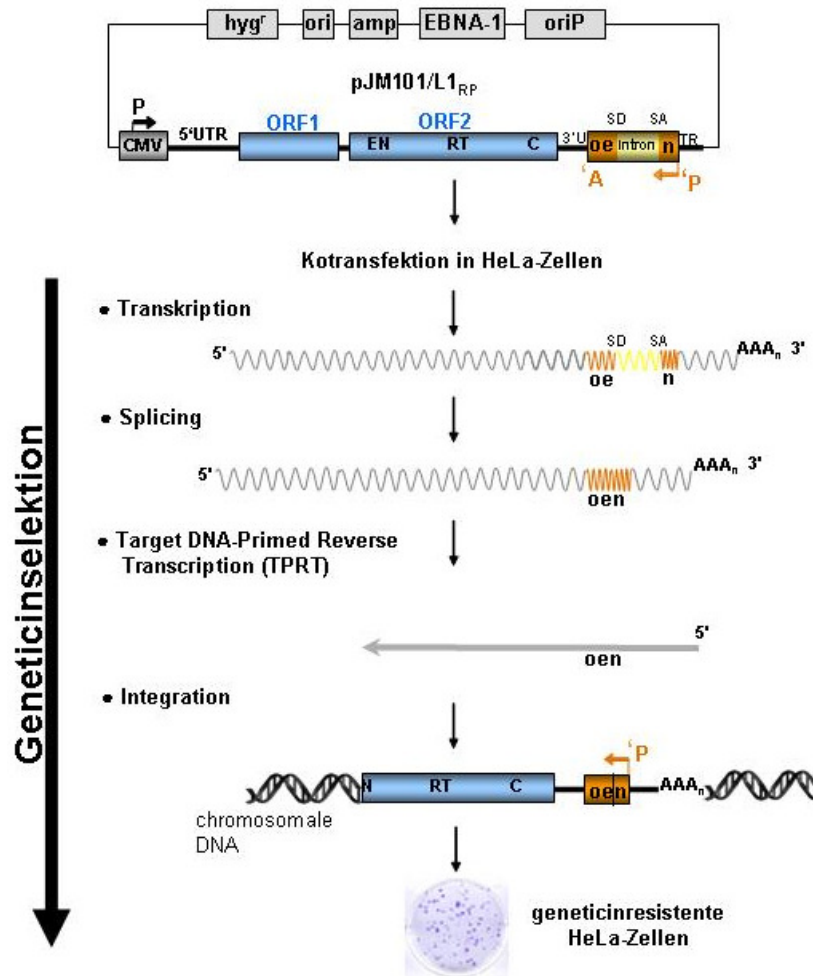


Abbildung 16: Schematische Darstellung des L1-Retrotranspositionsreporterassays. Nach Transfektion des L1-Reporterplasmids pJM101/L1_{RP} in HeLa-Zellen wird die L1-Kassette auf dem Plasmid transkribiert, und das γ -Globin-Intron durch „splicing“ entfernt. Nach anschließender reverser Transkription der neo-markierten L1-RNA und ihrer Integration ins Genom führt die Selektion mit Geneticin zu geneticinresistenten Kolonien, die das Neomycin-Phosphotransferasegen exprimieren.

stehenden Genen in Säugerzellen ermöglicht (Fuerst und Moss, 1989; Elroy-Stein und Moss, 1990; Sutter und Moss, 1992). Goodier *et al.* (2004) etablierten das MVA/T7RP-System für die Expression L1-kodierter Proteine in transformierten Zelllinien und Primärzellen, indem sie die beiden ORFs des aktiven L1.2A-Elements jeweils in den Vektor pMini-SC klonierten und damit unter die Kontrolle des T7-Promotors stellten (S. 29).

Um das MVA/T7RP-Expressionssystem zu nutzen, wurden zunächst 3×10^5 HeLa-Zellen je Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Die Infektion der Zellen mit MVA/T7RP erfolgte ca. 48 Stunden später, wenn die Zellen eine Konfluenz von 70 – 80 % erreicht hatten. Vor der Infektion wurde die Virusstammlösung zur Vereinzelung der Viruspartikel 3×1 min sonifiziert. Der Virustiter wurde anschließend mit DMEM / 2 % FKS auf 5×10^5 pfu / ml eingestellt, so dass die „*Multiplicity Of Infection*“ (MOI) 1 betrug. Für den Infektionsvorgang wurde das alte Zellkulturmedium in der 6-Lochplatte durch 1 ml der MVA/T7RP-Virussuspension in DMEM ersetzt. Nach einer Infektionszeit von maximal 60 min erfolgte zuerst die Zugabe von je 1 ml DMEM / 2 % FKS sowie unmittelbar darauf die Transfektion

mit je 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl FUGENE6-Transfektionsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers. Ca. 18 h später wurden die Zellen geerntet und es wurden Zelllysate mit dem Ziel der Immunopräzipitation (Kap. 2.4.5) hergestellt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinpräparation aus eukaryotischen Zellen

Für die Präparation von Zelllysaten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in eiskaltem Tripel-Lysepuffer lysiert. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur konnten die Lysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und anschließend bei -80 °C gelagert werden.

Tripel-Lysepuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5	Roth (Karlsruhe)
	150 mM	NaCl	Roth (Karlsruhe)
	10 mM	EDTA	Merck (Darmstadt)
	0,1 %	SDS	Roth (Karlsruhe)
	1 %	Triton-X 100	Merck (Darmstadt)
	1 %	Desoxycholat	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode

Die Zelllysate wurden auf Eis aufgetaut und anschließend sonifiziert (Sonifier II 250, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd). Darauf folgte das Abzentrifugieren der Zelltrümmer und unlysierten Zellen für 2 min bei 17.000 g und 4 °C. Im nächsten Schritt wurden 5 µl Zelllysate zuerst mit 45 µl Wasser und danach mit 1 ml BCA-Lösung (Bichinoninsäure : Kupfer (II)-Sulfatlösung = 50 : 1; Sigma-Aldrich, Steinheim) gemischt. Die Proben wurden anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen reagierten die Cu²⁺-Ionen mit den Proteinen zu Cu¹⁺-Ionen, die mit der Bichinoninsäure einen violetten Komplex bildeten. Dieser quantitative Farbumschlag ließ sich kalorimetrisch bestimmen. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg). Die Bestimmung erfolgte für jedes Lysat im Triplikat. Als Proteinstandard dienten verschiedene Verdünnungen einer wässrigen BSA-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim).

2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

20 µg Zelllysate wurden mit Wasser und 1 x Probenauftragspuffer auf ein maximales Volumen von 30 µl eingestellt. Der Probenauftragspuffer enthielt 2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe), das die Disulfidbrücken innerhalb von Proteinen auflöst. Auf diese Weise ist die Auftrennung der Proteine allein nach ihrer Größe gewährleistet. Im nächsten Schritt erfolgte eine Denaturierung der Proben für 10 min bei 95 °C sowie anschließend das Beladen der Gelgefäße eines denaturierenden **Polyacrylamid-(PAA)**-gels. Die Proteine der verschiedenen Zelllysate wurden daraufhin nach einer Aufkonzentration durch ein 4 %iges Sammelgel in einem 12%igem Trenngel elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die hierfür genutzte Mini-PROTEAN II-Apparatur (Bio-Rad Laboratories, München) wurde mit 90 V und 400 mA betrieben. Zur Größenbestimmung wurde ein Größenmarker in Form einer Proteinleiter (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen.

4 x Sammelgelpuffer:	1 g	SDS	Roth (Karlsruhe)
	15,1 g	Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
	add. 500 ml	H ₂ O deion.	
	pH 6,8		
4 x Trenngelpuffer:	1 g	SDS	Roth (Karlsruhe)
	45,6 g	Tris-Base	Roth (Karlsruhe)
	add. 500 ml	H ₂ O deion.	
	pH 8,8		
3 x Probenauftragspuffer:	1,75 ml	4 x Sammelgelpuffer	
	1,5 ml	Glycerin	Roth (Karlsruhe)
	5 ml	SDS (10 % w/v)	Roth (Karlsruhe)
	0,5 ml	2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
	1,25 ml	Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Laufpuffer für PAA-Gele:	5 mM	Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
	250 mM	Glycin	Roth (Karlsruhe)
	0,1 %	SDS	Roth (Karlsruhe)
	pH 8,3		

4 %-iges Sammelgel:	2 ml	Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe)
(für 0,75 mm-„Spacer“)	1,25 ml	4 x Sammelgelpuffer	
	5 µl	TEMED	Merck (Darmstadt)
	25 µl	APS (10 % w/v)	Roth (Karlsruhe)
	add. 5 ml	H ₂ O deion.	
12 %-iges Trenngel:	0,266 ml	Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe)
(für 0,75mm-„Spacer“)	0,5 ml	4 x Trenngelpuffer	
	2 µl	TEMED	Merck (Darmstadt)
	10 µl	APS (10 % w/v)	Roth (Karlsruhe)
	add. 2 ml	H ₂ O deion.	

2.4.4 Immunoblotanalyse

Für den Transfer von im PAA-Gel aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman, Dassel) wurde die Mini-PROTEAN II-Immunoblotapparatur (Bio-Rad Laboratories, München) verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 17 dargestellt.

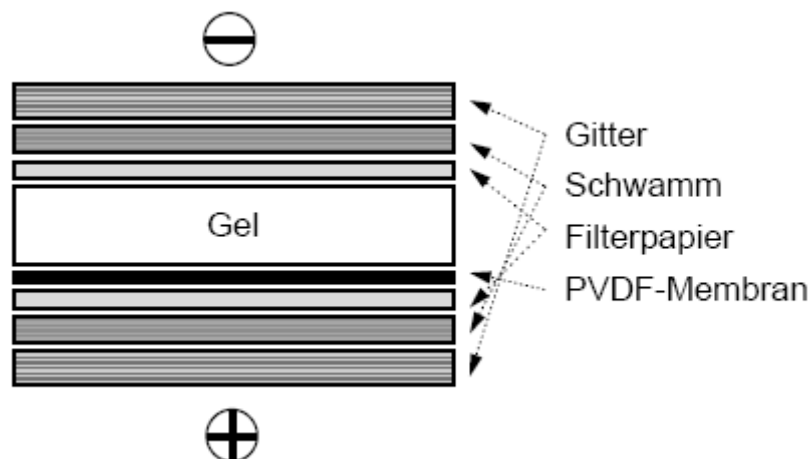


Abbildung 17: Schematischer Aufbau einer Western-Blot-Apparatur. Auf das kathodenseitige Gitter folgte zuerst ein Schwamm und danach eine Lage 3 mm-Filterpapier. Auf das Filterpapier wurde die Nitrocellulosemembran gelegt. Auf der Membran lag das Acrylamidgel, gefolgt von einer Lage Filterpapier. Den Abschluß bildeten ein weiterer Schwamm und das andere Ende des Gitters.

Der Transfer der Proteine aus dem Acrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht mit 30 V und 90 mA. Anschließend wurde der Transfer durch eine Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau-S (Sigma-Aldrich, Steinheim) überprüft. Dafür wurde die Membran zuerst für ca. 1 min in Ponceau-S-Lösung inkubiert und anschließend bis zum Sichtbarwerden definierter Banden mit Wasser gespült.

Für die Immunodetektion wurde die Nitrocellulosemembran in einem ersten Schritt in Blockierlösung (PBS mit 5 % Magermilchpulver) für mindestens 3 h inkubiert. Damit sollte das unspezifische Binden der Antikörper vermindert werden. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % TWEEN 20) für jeweils 10 min bei Raumtemperatur schloss sich die Inkubation mit der Primärantikörperlösung (PBS mit 5 % Magermilchpulver und Primärantikörper) über Nacht bei 4 °C an. Am nächsten Tag wurde die Membran mit Waschpuffer 3 x 10 min gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in Sekundärantikörperlösung (PBS mit 1,67 % Magermilchpulver und Sekundärantikörper) für 45 min bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein erneutes dreimaliges Waschen für je 10 min mit Waschpuffer an. Alle Sekundärantikörper waren mit „horseraddish“-Peroxidase gekoppelt. Diese Peroxidase setzte das Substrat im Detektionsreagenz ECL plus (Amersham Biosciences, Freiburg) um. Dabei emittierte Licht, das mit entsprechenden Photofilmen (Hyperfilm, Amersham Biosciences, Freiburg; Medizinische Röntgenfilme Super RX, Fuji, Düsseldorf) detektiert wurde. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper enthält Tabelle 5.

Tabelle 5: Übersicht der für die Immunoblotanalyse verwendeten Antikörper.

Primärantikörper			
Bezeichnung	Organismus	Verdünnung	Hersteller
α-HA, monoklonal	Maus	1 : 5.000	Covance Laboratories, Münster
α-V5, monoklonal	Maus	1 : 3.000	Invitrogen, Karlsruhe
α-L1-ORF1p (#984), monoklonal	Kaninchen	1 : 2.000	Eurogentec, Köln
α-FLAG, polyklonal	Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling, Danvers MA, USA
α-T7-Polymerase, monoklonal	Maus	1 : 10.000	Novagen Merck, Darmstadt
α-β-Aktin, monoklonal	Maus	1 : 30.000	Sigma-Aldrich, Steinheim
α-Lamin A, monoklonal	Kaninchen	1 : 3.000	BioLegend, San Diego CA, USA
Sekundärantikörper			
Bezeichnung	Organismus	Verdünnung	Hersteller
α-Maus, peroxidasegekoppelt	Schaf	1 : 10.000	Amersham Biosciences, Freiburg
α-Kaninchen, peroxidasegekoppelt, F(ab') ₂ -Fragment	Esel	1 : 30.000	Amersham Biosciences, Freiburg

Um die Nitrocellulosemembran für eine weitere Antikörperdetektion benutzen zu können, wurde sie für 20 min in „Stripping“-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schlossen sich ein dreimaliges Spülen sowie ein dreimaliges Waschen für je 10 min mit Waschpuffer an.

Blotpuffer:	25 mM	Tris-Base	Roth (Karlsruhe)
	192 mM	Glycin	Roth (Karlsruhe)
	15 %	Methanol	Roth (Karlsruhe)
	add. 1 l	H ₂ O deion.	
"Stripping"-Puffer:	100 mM	2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,7	Roth (Karlsruhe)
	2 %	SDS	Roth (Karlsruhe)
	add. 1 l	H ₂ O deion.	

2.4.5 Immunopräzipitation

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS-Dulbecco (Biochrom, Berlin) gewaschen und anschließend in eiskaltem Nicht-denaturierenden Lysepuffer mittels Zellschabern abgeschabt (500 µl Lysepuffer je Vertiefung einer 6-Lochplatte). Nach einer Inkubation für 30 min bei 4 °C in einem Rollrad erfolgte das Abzentrifugieren der Zelltrümmer und nicht lysierten Zellen für 5 min bei 4 °C und 17.000 g. Danach wurde ein Aliquot (30 µl) des Zelllysates für Immunoblotanalysen entnommen. Währenddessen erfolgte das Äquilibrieren des matrixgekoppelten Antikörpers (HA-Matrix, Roche Diagnostics, Mannheim) durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml Nicht-denaturierendem Lysepuffer. Die verbleibenden ca. 470 µl Zelllysate wurden mit Nicht-denaturierendem Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 700 µl aufgefüllt und anschließend mit 30 µl HA-Matrix vermischt. Die Antikörperreaktion erfolgte während einer Inkubation auf einem Rollrad bei 4 °C für mindestens 5 h. Abschließend wurden die Proben dreimal mit je 1 ml eiskaltem Nicht-denaturierendem Lysepuffer gewaschen und das Matrixpellet in 30 µl IP-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse der Präzipitate erfolgte über einen Immunoblot (Kap. 2.4.4).

Nicht-denaturierender Lysepuffer:	20 mM	Tris-HCl pH8	Roth (Karlsruhe)
	137 mM	NaCl	Roth (Karlsruhe)
	10 %	Glycerin	Roth (Karlsruhe)
	1 %	Igepal	Sigma (Steinheim)
	2 mM	EDTA	Merck (Darmstadt)

IP-Probenpuffer:	20 mM	Tris pH7,5	Roth (Karlsruhe)
	2 mM	EDTA	Merck (Darmstadt)
	5 %	SDS	Roth (Karlsruhe)
	0,02 %	Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
	20 %	Glycerin	Roth (Karlsruhe)
	200 mM	DTT	Roth (Karlsruhe)

2.4.6 Immunofluoreszenz

Zuerst wurde je ein steriles Deckgläschen (Roth, Karlsruhe) in jede Vertiefung einer 6-Lochplatte platziert und anschließend je Vertiefung 2×10^5 HeLa-Zellen oder 3×10^5 143B-Zellen ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Transfektion mit je 0,5 µg eines APOBEC-Expressionsplasmid und 0,5 µg des L1-Reporterplasmids pDK101 sowie 3 µl FUGENE6-Transfektionsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, indem zuerst das Zellkulturmedium entfernt, danach die Zellen ein Mal mit PBS-Dulbecco (Biochrom, Berlin) gespült und anschließend für zehn Minuten in 2 ml Fixierungspuffer inkubiert wurden. Nach einem dreiminütigem Waschen in PBS-Dulbecco konnten die fixierten Zellen bei 4 °C in PBS-Dulbecco gelagert werden.

Zur Vorbereitung der Immunreaktion wurden die Zellen für zehn Minuten in 2 ml Permeabilisierungspuffer inkubiert und anschließend 3 x 3 min mit PBS-Dulbecco gewaschen. Um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper zu vermeiden, schloß sich eine Inkubation für mindestens zwei Stunden in Blockierungspuffer an. Anschließend wurden zuerst die Deckgläschen mit den fixierten Zellen in neue, trockene 6-Lochplatten überführt und anschließend mit je 100 µl Antikörperpuffer, der mit den beiden Primärantikörpern (Tab. 6) versetzt wurde, bedeckt. Nach einer Stunde wurde die Antikörperreaktion durch 3 x 5 min Waschen mit PBS-Dulbecco abgebrochen. Es schloß sich das Überführen der Deckgläschen in neue, trockene 6-Lochplatten an. Als nächstes wurde jedes Deckgläschen mit je 100 µl Antikörperpuffer, der beide Sekundärantikörper enthielt (Tab. 6), belegt. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Antikörper zu vermeiden, erfolgten ab diesem Zeitpunkt alle Inkubationsschritte in einem geschlossenen, lichtundurchlässigen Behältnis. Die Sekundärantikörperreaktion wurde nach 30 min durch 3 x 5 min Waschen mit PBS-Dulbecco beendet. Um im nächsten Schritt die Zellkerne anzufärben, wurden die Deckgläschen zuerst in neue, trockene 6-Lochplatten überführt und anschließend mit je 100 µl DAPI-Färbepuffer bedeckt. Nach maximal 3 min erfolgte das Abbrechen der Färbung durch Waschen für 3 x 10 min mit PBS-Dulbecco. Danach wurde je ein Tropfen Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham AL, USA) auf einen Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgebracht. Die

Deckgläschen konnten anschließend mit den fixierten Zellen auf der Unterseite auf diesen Tropfen möglichst luftblasenfrei aufgelegt werden. Die Präparate trockneten über Nacht und wurden dann lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem „*laser scanning*“-Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena).

Fixierungspuffer:	4 %	Paraformaldehyd in PBS-Dulbecco	Merck (Darmstadt) Biochrom (Berlin)
Permeabilisierungspuffer:	1 %	Triton X-100 in PBS-Dulbecco	Sigma (Steinheim) Biochrom (Berlin)
Blockierungspuffer:	5 % 0,1 %	Albumin Fraktion V Triton X-100 in PBS-Dulbecco	Roth (Karlsruhe) Sigma (Steinheim) Biochrom (Berlin)
Antikörperpuffer:	5 %	Albumin Fraktion V in PBS-Dulbecco	Roth (Karlsruhe) Biochrom (Berlin)
DAPI-Färbepuffer:		DAPI 1 : 1.000 in PBS-Dulbecco	Sigma (Steinheim) Biochrom (Berlin)

Tabelle 6: Übersicht der für die Immunofluoreszenz verwendeten Antikörper.

Primärantikörper			
Bezeichnung	Organismus	Verdünnung	Hersteller
α-HA, polyklonal	Kaninchen	1 : 500	eBioscience, Hatfield, UK
α-T7, monoklonal	Maus	1 : 500	Novagen Merck, Darmstadt
Sekundärantikörper			
Bezeichnung	Organismus	Verdünnung	Hersteller
α-Kaninchen, Alexa488-gekoppelt	Esel	1 : 500	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe
α-Maus, Alexa594- gekoppelt	Esel	1 : 500	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe

2.4.7 Auftrennung von Zelllysaten über einen Saccharosegradienten

In einem Saccharosegradienten werden Proteine und Proteinkomplexe entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Dadurch sind Rückschlüsse auf die Zusammensetzung von Komplexen sowie auf die Interaktion einzelner Proteine möglich.

Mit Hilfe eines Gradientenmischers (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde ein Gradient von 10 – 50 % Saccharose gegossen. Daran schloss sich das Übersichten mit 1 ml

Zelllysate an. Die Auftrennung erfolgte in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (14 x 89 mm; Beckman Coulter, Fullerton CA, USA) bei 168.000 g für 13 – 15 Stunden über Nacht und bei 4 °C (Rotor SW41, Zentrifuge Optima™ L80 XP). Am nächsten Morgen wurden die Zentrifugenröhrchen mit einer sterilen Kanüle am Boden angestochen und Fraktionen von je 1 ml in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Fraktionen wurden in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (13 x 51 mm bzw. 11 x 60 mm; Beckman Coulter, Fullerton CA, USA) überführt und mit ca. 3 ml DEPC-H₂O gemischt. Die Rotoren SW55 bzw. SW60 (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA) wurden mit den gefüllten Zentrifugenröhrchen beladen. Es schloss sich die Pelletierung der Proteinfractionen bei 176.000 g für 2 h bei 4 °C an. Das Pellet wurde jeweils in 20 µl DEPC-H₂O (1 x COMPLETE Proteaseinhibitormix; Roche Diagnostics, Mannheim) gelöst. Die Analyse der fraktionierten und pelletierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (Kap. 2.4.3) und Immunoblotanalyse (Kap. 2.4.4).

Um die Überstände der einzelnen Fraktionen zu analysieren, wurden die Proteine mittels Trichloressigsäure (Roth, Karlsruhe) gefällt. Das erfolgte durch das Vermischen mit ¼ Volumen Trichloressigsäure (10 % w / v). Nach einer Inkubation für 30 min bei 4 °C schloss sich die Pelletierung der Proteine in 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 17.000 g und 4 °C für 10 min an. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen mit je 500 µl eiskaltem Aceton (Roth, Karlsruhe). Der nächste Schritt war das Lösen des luftgetrockneten Pellets in 20 µl DEPC-H₂O (1 x COMPLETE Proteaseinhibitormix; Roche Diagnostics, Mannheim). Abschließend wurden die Präzipitate mittels Immunoblotanalyse (Kap. 2.4.4) charakterisiert.

2.5 Statistische Analysen

Tabelle 7: Definitionen statistischer Termini

Terminus	Definition
Auftrittswahrscheinlichkeit in der L1-Referenzsequenz (P_{L1})	$\frac{\text{Anzahl jedes einzelnen Nukleotids in der L1-Referenzsequenz}}{\text{Anzahl aller Nukleotide in der L1-Referenzsequenz}}$
Auftrittswahrscheinlichkeit an der 5'-Abbruchstelle (P_B)	$\frac{\text{Anzahl jedes einzelnen Nukleotids an der L1-5'-Abbruchstelle}}{\text{Anzahl aller untersuchten 5'-verkürzten L1-Insertionen}}$
relative Auftrittswahrscheinlichkeit	$\frac{P_{L1}}{P_B}$

2.5.1 Charakterisierung der 5'-Enden 5'-verkürzter *de novo* L1-Insertionen

Die Analyse der 5'-Enden von 5'-verkürzten *de novo* L1-Insertionen, die in Symer *et al.* (2002) und Gilbert *et al.* (2005) beschrieben wurden, erfolgte mit dem ClustalW-„Alignment“-Algorithmus des Softwarepaketes VectorNTI (Invitrogen, Karlsruhe). Hierfür wurde die

Sequenz der Abbruchstelle am 5'-Ende der jeweiligen L1-Insertion mit der Nukleotidsequenz des aktiven L1.3-Elements (Dombroski *et al.*, 1993) verglichen, die als Referenzsequenz diente. Die Liste dieser Vergleiche enthält Anhang A (S. 127). Anschließend konnten die Auftretswahrscheinlichkeit der ersten fehlenden Nukleobase der 5'-verkürzten *de novo* Insertionen bestimmt werden. Von der Analyse ausgeschlossen waren vollständige, intakte L1-Insertionen oder solche, die an ihrem 5'-Ende Inversionen aufwiesen. Außerdem wurden nur die Insertionen charakterisiert, die aus HeLa-Zellen stammten. Von den ebenfalls in Symer *et al.* (2002) ebenfalls beschriebenen *de novo* L1-Insertionen aus HCT116-Zellen waren nur 14 Insertionen 5'-verkürzt und ohne Inversionen am 5'-Ende, so dass eine statistische Analyse nicht sinnvoll war.

Die Auftretswahrscheinlichkeit an der 5'-Abbruchstelle der L1-Insertionen (Tab. 7) wurde mit der Auftretswahrscheinlichkeit in der L1.3-Referenzsequenz (Tab. 7) verglichen. Mittels eines Chi-Quadrat-Anpassungstestes (χ^2 -Test) wurde untersucht, ob die Nukleotidverteilung an der 5'-Abbruchstelle mit der Verteilung im gesamten L1.3-Element übereinstimmt. Dafür fand die Routine `chisq.test` Verwendung (<http://www.r-project.org>).

2.5.2 Identifizierung endogener, kanonischer, 5'-verkürzter L1-Kopien aus dem humanen Genom

Für die Analyse 5'-verkürzter, bereits vorhandener genomischer L1-Insertionen wurde die von Zingler *et al.* (2005) erstellte Datenbank (http://www.zbh.uni-hamburg.de/research/GI/resources/zingler_willhoeft_et al2004.php) verwendet. Die unter diesem „link“ aufgelisteten Dateien „L1_coord_seq.txt“ und „L1_selection.xls“ wurden für die Untersuchungen herangezogen. Die Datei „L1_coord_seq.txt“ enthält die Sequenzdaten von 10.031 L1-Insertionen, die jeweils ein vollständiges 3'-Ende, TSDs sowie eine Polyadenylierung am 3'-Ende besitzen. Diese Sequenzdaten umfassen neben der L1-Sequenz auch die jeweilige TSD, Mikrohomologien sowie jeweils bis zu 150 Nukleotide der 5'- und 3'-flankierenden genomischen DNA. Die Datei „L1_selection.xls“ enthält Informationen zu den 3.000 kanonischen L1-Insertionen, die von Zingler *et al.* (2005) analysiert wurden. Im ersten Schritt wurden alle L1-Standardinsertionen mit Mikrohomologien von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da die Nukleotidsequenz der Mikrohomologien sowohl vom L1-Element als auch aus der flankierenden genomischen DNA stammen könnte und deshalb das 5'-Ende der L1-Insertion nicht genau bestimmt werden kann. Die 1.360 verbleibenden L1-Insertionen wurden anschließend von den TSDs und den flankierenden Sequenzen bereinigt. Als nächstes wurde mittels des ClustalW-Algorithmus ein „alignment“ jeder L1-Insertion sowohl mit der Referenzsequenz L1.3 (Anhang B) als auch mit der Sequenz L1.3NZ (Anhang B) erstellt. Die L1.3NZ-Sequenz umfaßt die L1.3-Sequenz, die um eine polymorphe, 131 bp

lange Sequenz in der 5'-UTR ergänzt wurde (Hattori *et al.*, 1985). 308 L1-Insertionen konnten eindeutig L1.3 zugeordnet werden, während 161 L1-Insertionen eindeutig mit L1.3NZ übereinstimmten. Die 5'-Enden der übrigen L1-Elemente liegen „*downstream*“ der polymorphen Region in der 5'-UTR, so dass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. Dabei erfolgte ein Abgleich der im „*alignment*“ bestimmten 5'-Abbruchpositionen der L1-Insertionen mit den in der Datei „L1_selection.xls“ angegebenen Positionen. 29 L1-Insertionen mit abweichenden Angaben wurden von der Analyse ausgeschlossen. Weiterhin wurden alle 446 als vollständige L1-Kopien definierte Sequenzen ausgeschlossen. In diese Gruppe waren auch alle L1-Sequenzen eingeschlossen, denen am 5'-Ende die ersten 1 – 12 Nukleotide der L1.3-Referenzsequenz fehlten. Unter den verbleibenden 885 L1-Insertionen wurden die relativen Auftrittswahrscheinlichkeiten (Tab. 7) der ersten nicht mehr in das Genom integrierten L1-Nukleobase bestimmt. Das wurde analog auch für die 12 L1-Nukleobasen in 5'- bzw. 3'-Richtung dieser Position durchgeführt. Die Auftrittswahrscheinlichkeit an der 5'-Abbruchstelle wurde mittels eines Chi-Quadrat-Anpassungstestes mit der Auftrittswahrscheinlichkeit in der L1.3-Referenzsequenz verglichen (Kap. 2.5.1).

3 Ergebnisse

3.1 Arbeitshypothese zum Mechanismus der Hemmung der L1-Retrotransposition durch APOBEC3-Proteine

APOBEC3-Proteine sind potente Inhibitoren exogener und endogener Retroviren sowie von Retrotransposons (Chiu und Greene, 2008). Die Deaminaseaktivität der APOBEC3-Proteine spielt bei der Hemmung von Retroviren und LTR-Retrotransposons eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass im Falle von HIV Δ vif die Minusstrang-cDNA durch A3G editiert wird (Yu *et al.*, 2004). Die auf dieser Deaminierung von Cytosinen beruhenden G-zu-A-Hypermutationen konnten sowohl für andere Viren wie „*Simian Immunodeficiency Virus*“ (SIV; Yu *et al.*, 2004) und „*Simian Foamy Virus*“ (SFV, Delebecque *et al.*, 2006) als auch für LTR-Retrotransposons wie Ty1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Schumacher *et al.*, 2005), IAP und MusD aus der Maus (Esnault *et al.*, 2005) sowie für das endogene Retrovirus HERV-K im Menschen (Lee und Bieniasz, 2007; Lee *et al.*, 2008) nachgewiesen werden. Obwohl die L1-Retrotransposition durch die Anwesenheit von A3-Proteinen gehemmt wird (Muckenfuß *et al.*, 2006; Esnault *et al.*, 2005), konnten A3-spezifische G-zu-A-Hypermutationen weder in bereits vorhandenen, im Genom manifestierten L1-Kopien noch in *de novo* L1-Insertionen nachgewiesen werden. Dennoch konnten Muckenfuß *et al.* (2006) für APOBEC3A zeigen, dass eine funktionsfähige Deaminasedomäne essentiell für die Inhibierung der L1-Aktivität ist.

Die Deaminierung von Cytosinen in DNA führt zum Auftreten von Uracilen. Diese werden von BER-Enzymen erkannt, entfernt und durch die korrekte Base ersetzt (Kap. 1.3; Lindahl *et al.*, 1997). Die Rekrutierung und Aufnahme des BER-Enzyms UNG2 in HIV- und SIV-Partikel konnte nachgewiesen werden (Priet *et al.*, 2003). Daher wurde die Beteiligung von Faktoren des BER-Weges an der A3-abhängigen Restriktion von Retroviren vorgeschlagen (Harris *et al.*, 2003). Auf dieser Grundlage entwickelte ich eine Arbeitshypothese der L1-Inhibierung durch APOBEC3-Proteine mittels Editierung der L1-cDNA unter Beteiligung von BER-Enzymen. Diese Arbeitshypothese soll im Folgenden skizziert werden (Abb. 18):

Die Insertion einer neuen L1-Kopie beginnt mit dem Schneiden des ersten genomischen DNA-Stranges durch die Endonukleasedomäne von L1-ORF2p an der L1-Konsensus-Zielsequenz 3'-AA↑TTTT-5'. Es kommt zum „Aufschmelzen“ der Doppelstrang-DNA über einen kurzen Bereich am 3'-Ende der Schnittstelle, so dass sich das 3'-Ende der L1-mRNA über komplementäre Basenpaarung des polyA-Schwanzes mit der genomischen polyT-Sequenz an das durch das Schneiden entstandene 3'-Ende anlagern kann. Über die generierte freie 3'-OH-Gruppe kann nun durch den TPRT-Prozeß (Kap. 1.1.6) die L1-Minusstrang-cDNA synthetisiert werden. Auf Grundlage des bisherigen Wissens zum L1-

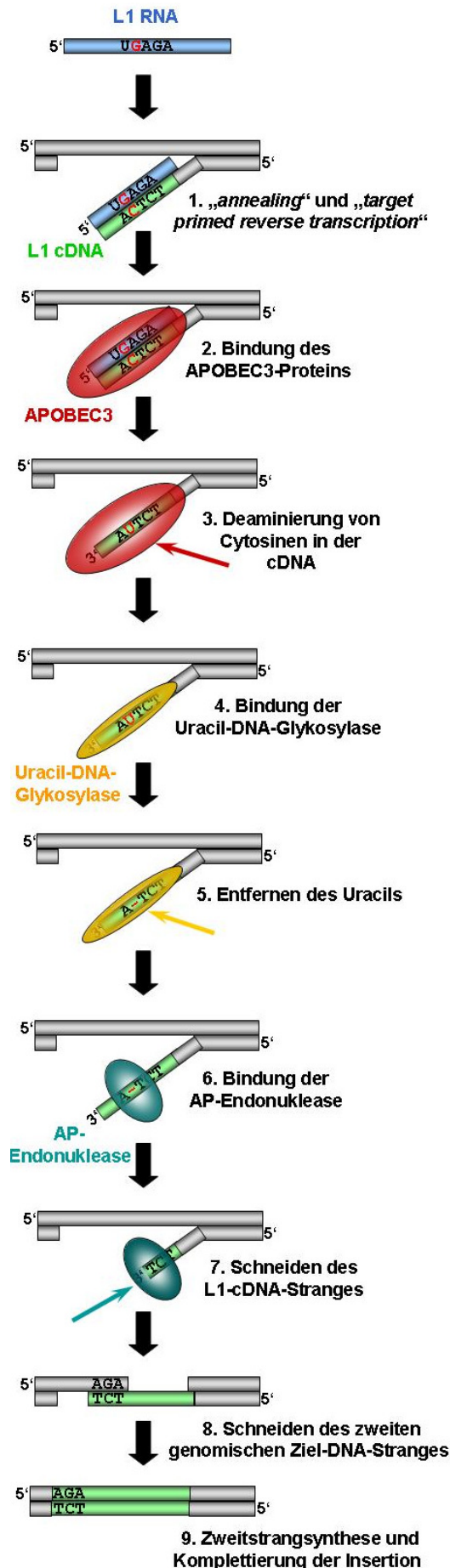


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Arbeitshypothese: L1-Inhibierung durch APOBEC3-Proteine mittels Editierung der L1-cDNA unter Beteiligung von BER-Enzymen. (1) „annealing“ der L1-RNA (blau) und TPRT führt zur Synthese der L1-Minusstrang-cDNA (grün). (2) APOBEC3-Protein (rot) bindet an die L1-cDNA. (3) APOBEC3-Protein deaminiert das Cytosin (rot) in der L1-cDNA zu Uracil (roter Pfeil). (4) Uracil-DNA-Glykosylase (gelb) erkennt das Uracil (rot) und bindet an die L1-cDNA. (5) Uracil-DNA-Glykosylase entfernt das Uracil aus der L1-cDNA (gelber Pfeil). (6) AP-Endonuklease (türkis) erkennt die entstandene Lücke und bindet an die L1-cDNA. (7) AP-Endonuklease schneidet die L1-cDNA am 5'-Ende der Lücke. Dadurch wird die L1-cDNA 3'-verkürzt. (8) Das Schneiden des zweiten genomischen DNA-Stranges leitet die Zweitstrangsynthese ein. Die Anlagerung der L1-cDNA an die genomische DNA erfolgt möglicherweise über Mikrohomologien. (9) Die Kompletierung der Insertion resultiert in einer 5'-verkürzten *de novo* L1-Insertion. Ein Guanin der ursprünglichen L1-Sequenz ist somit die erste Nukleobase, die an die endständige Nukleobase am 5'-Ende der 5'-verkürzten L1-Sequenz angrenzt.

Replikationszyklus ist das der einzige Zeitpunkt, an dem APOBEC3-Proteine eine einzelsträngige L1-DNA editieren könnten. Gemäß unserer Hypothese lagert sich APOBEC3 an die L1-cDNA an und deaminiert Cytosin zu Uracil. Dieses Uracil wird anschließend von einer zellulären Uracil-DNA-Glykosylase erkannt, die dann das Uracil entfernt. Das Phosphat-Zucker-Rückgrat der DNA bleibt aber intakt. Im nächsten Schritt erkennt eine AP-Endonuklease die entstandene Lücke und schneidet die L1-cDNA am 5'-Ende dieser Lücke. Es entsteht ein am 3'-Ende verkürzter cDNA-Strang. Abschließend erfolgen das Schneiden des zweiten genomischen DNA-Stranges, die Zweitstrangsynthese und damit die Vervollständigung der Insertion (Kap. 1.1.6). Das Ergebnis ist eine am 5'-Ende verkürzte *de novo* L1-Insertion ohne nachweisbare G-zu-A-Hypermutationen. Trifft das Modell zu, so sollte im Falle einer neu integrierten, 5'-verkürzten L1-Kopie das Guanin als erste fehlende Nukleobase nach der Abbruchstelle im „sense“-Strang überrepräsentiert sein.

3.2 Prüfung des Arbeitsmodells mittels *in silico*-Analyse der 5'-Enden 5'-verkürzter L1-Insertionen

3.2.1 5'-verkürzte *de novo* L1-Insertionen enden bevorzugt unmittelbar nach einem L1-kodierten Guanin

Um zu evaluieren, ob 5'-verkürzte *de novo* L1-Insertionen gemäß der Arbeitshypothese bevorzugt unmittelbar nach einem L1-kodierten Guanin abbrechen, wurden die 5'-Enden von 38 kürzlich publizierten *de novo* Retrotranspositionseignissen markierter L1-Reporterelemente (Symer *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2005) mit der L1.3-Referenzsequenz (Dombroski *et al.*, 1993) verglichen (Kap. 2.5.1; Abb. 19A). Die in Symer *et al.* (2002) beschriebenen L1-Insertionen stammen aus L1-Retrotranspositionsreporterassays, die mit dem aktiven L1.3-Element in HeLa-Zellen durchgeführt wurden, um den Effekt der L1-Retrotransposition auf das humane Genom zu untersuchen. Die in Gilbert *et al.* (2005) beschriebenen L1-Insertionen stammen von den aktiven L1-Elementen L1.2A, L1.3, LRE-2 und L1_{RP} (Moran *et al.*, 1996; Sassaman *et al.*, 1997; Kimberland *et al.*, 1999), die in L1-Retrotranspositionsreporterassays eingesetzt wurden, um die Beteiligung verschiedener zellulärer DNA-Reparaturmechanismen an Retrotranspositionseignissen in HeLa-Zellen zu charakterisieren. Die hier zugrundeliegenden L1-Retrotranspositionsreporterassays wurden nicht in Anwesenheit überexprimierter APOBEC3-Proteine durchgeführt. Allerdings zeigten Muckenfuß *et al.* (2006) mittels PCR-Analysen, dass A3B, A3C und A3H in HeLa-Zellen endogen exprimiert werden. Der Vergleich von 38 *de novo* L1-Insertionen (Anhang A) mit der L1.3-Referenzsequenz ergab, dass ausschließlich Guanin als erste fehlende Nukleobase vor der Abbruchstelle der L1-5'-Enden statistisch signifikant ($p = 0,00015$) überrepräsentiert ist

(Abb. 19B). Während man unter Berücksichtigung der Auftrittswahrscheinlichkeit in der L1.3-Referenzsequenz nur in sieben Fällen unmittelbar vor der Abbruchstelle ein Guanin erwarten würde, fand man jedoch tatsächlich 16 Fälle (Abb. 19B).

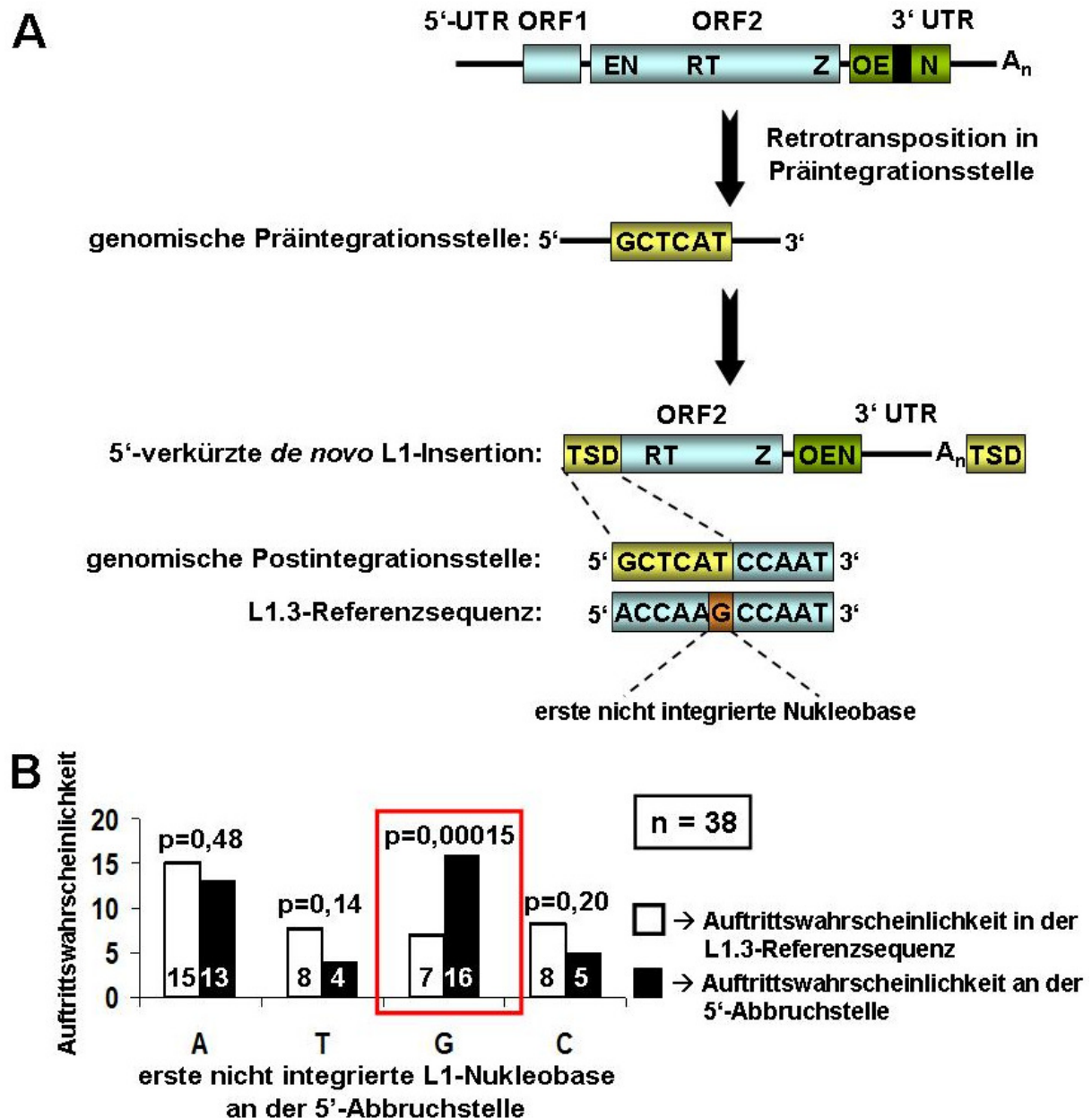


Abbildung 19: Bestimmung der Auftrittswahrscheinlichkeiten der vier L1-kodierten Nukleobasen an der Abbruchstelle 5'-verkürzter *de novo*-L1-Insertionen. (A) Die *de novo* L1-Insertionen stammen aus L1-Retrotranspositionsreporterassays in HeLa-Zellen mit markierten L1-Elementen (Symer *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2005). Ein „alignment“ 5'-verkürzter L1-Insertionen mit der L1.3-Referenzsequenz wurde durchgeführt und die erste nicht integrierte L1-Nukleobase ermittelt. (B) Balkendiagramm zum Vergleich der Auftrittswahrscheinlichkeit einer jeden der vier Nukleobasen innerhalb der L1.3-Referenzsequenz (schwarze Balken) mit der Auftrittswahrscheinlichkeit der Nukleobasen an der Abbruchstelle am 5'-Ende 5'-verkürzter L1-Kopien (weiße Balken). Guanin war als erste nicht integrierte L1-Nukleobase vor der Abbruchstelle 5'-verkürzter *de novo*-L1-Insertionen statistisch signifikant überrepräsentiert ($p = 0,00015$). Die Unterrepräsentation von Adenin, Thymin und Cytosin war statistisch nicht signifikant.

3.2.2 Im humanen Genom manifestierte 5'-verkürzte L1-Insertionen enden häufiger als theoretisch erwartet unmittelbar nach einem L1-kodierten Guanin

Um zu prüfen, ob die Ergebnisse zu den 5'-Enden von *de novo* L1-Insertionen, die aus Zellkulturexperimenten stammen, mit der Situation genomischer, bereits vorhandener, 5'-verkürzter L1-Kopien übereinstimmen, die im Genom des Menschen seit langem manifestiert sind, wurde eine genomweite *in silico*-Analyse durchgeführt (Kap. 2.5.2).

Für die Analyse der Abbruchstellen am 5'-Ende 5'-verkürzter L1-Insertionen mit biostatistischen Methoden wurde das Set von 885 endogenen 5'-verkürzten L1-Sequenzen herangezogen, dessen Identifizierung in Kapitel 2.5.2 beschrieben wurde. Die Auftrittswahrscheinlichkeit einer jeden der vier Nukleobasen (A, T, G, C) als erste fehlende Nukleobase an der Abbruchstelle der 5'-Enden wurde über „alignments“ mit den Referenzsequenzen L1.3 und L1.3NZ bestimmt und der Auftrittswahrscheinlichkeit in der L1.3- bzw. L1.3NZ-Referenzsequenz gegenübergestellt (Abb. 3.3A). Guanin ist die einzige Nukleobase, die an den Abbruchstellen der 5'-Enden endogener 5'-verkürzter L1-Kopien häufiger vorkommt als aufgrund ihrer Auftrittswahrscheinlichkeit in der L1.3- bzw. L1.3NZ-Referenzsequenz theoretisch erwartet werden würde (Abb. 20A). Obwohl der Unterschied zwischen der Auftrittswahrscheinlichkeit in der L1-Referenzsequenz (20,4 %) und der Auftrittswahrscheinlichkeit an der 5'-Abbruchstelle (24 %) vergleichsweise gering ist, so ist er dennoch statistisch signifikant ($p = 0,015$). Um zu untersuchen, ob die Abbruchstellen, die zu unterschiedlichen 5'-Enden führen, besondere Sequenzmotive gemeinsam haben, wurde die L1-Nukleobasenzusammensetzung in der Umgebung der Abbruchstelle untersucht. Zu diesem Zweck wurden von der jeweiligen L1-Sequenz jeweils 12 Nukleobasen unterhalb (-12) und oberhalb (+12) der Abbruchstelle mit der L1-Referenzsequenz (L1.3 oder L1.3NZ) verglichen. Da sich das 5'-Ende der 5'-UTR durch mehrere Guaninfolgen auszeichnet, die das Ergebnis der *in silico*-Analysen verfälschen könnten, wurden für die Analysen nur solche endogenen L1-Elemente herangezogen, die relativ zum vollständigen L1-Element (L1.3 bzw. L1.3NZ) um mindestens 12 Nukleobasen verkürzt sind. Das Ergebnis dieser *in silico*-Analyse zeigt Abb. 20B. Die relativen Auftrittswahrscheinlichkeiten einer der vier Nukleobasen an Position -12 bis +12 relativ zur Abbruchstelle am 5'-Ende von L1 ist aufgezeigt. Die erste fehlende L1-Nukleobase, die an die Abbruchstelle angrenzt, hat die Position -1 und ist häufiger ein Guanin als theoretisch erwartet (Abb. 20B). Thymin, Adenin und Cytosin zeigen hier eine etwas geringere Auftrittswahrscheinlichkeit, als es aufgrund der Auftrittswahrscheinlichkeit innerhalb der Referenzsequenzen erwartet werden würde. Besonders auffällig ist die relative Auftrittswahrscheinlichkeit der einzelnen Nukleobasen an

Position 0, dem endständigen Nukleotid einer 5'-verkürzten L1-Insertion. Cytosin ist an dieser Position deutlich überrepräsentiert ($p \leq 2 \cdot 10^{-16}$).

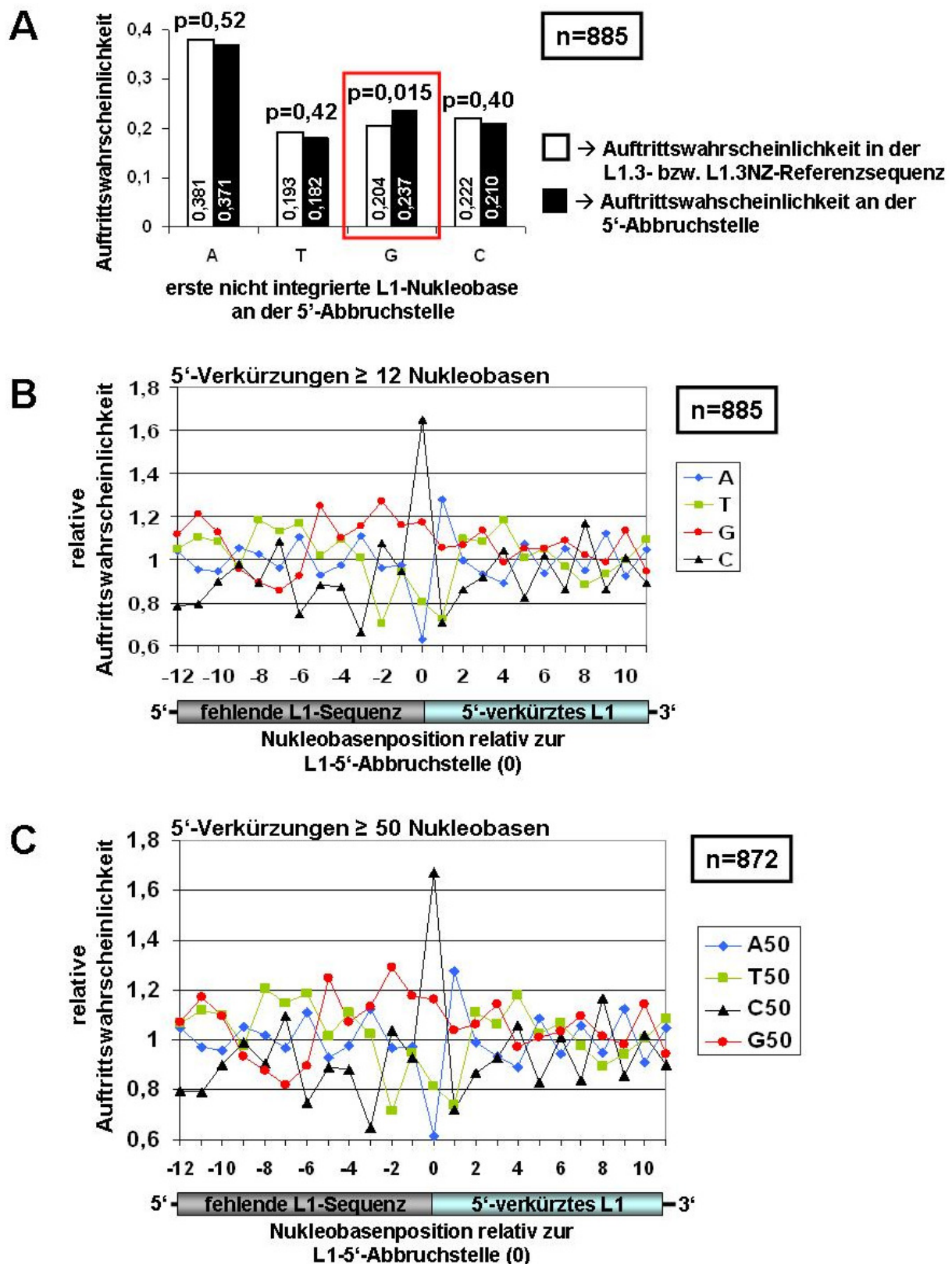


Abbildung 20: Bestimmung der Auftretswahrscheinlichkeit der Nukleobasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin im Bereich der Abbruchstelle genomischer 5'-verkürzter L1-Elemente. (A) Ein „alignment“ 5'-verkürzter präexistierende L1-Insertionen mit den L1.3- bzw. L1.3NZ-

Referenzsequenzen wurde erstellt und die erste nicht mehr integrierte Nukleobase ermittelt. Die Auftretswahrscheinlichkeit (weißer Balken) jeder Nukleobase an der 5'-Abbruchstelle wurde der Auftretswahrscheinlichkeit (schwarzer Balken) in der L1.3- bzw. L1.3NZ-Referenzsequenz gegenübergestellt. Guanin war in 24 % der 885 analysierten L1-Insertionen die erste nicht mehr integrierte Nukleobase. Erwartet wurden 20,4 % solcher Elemente. Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,015$). **(B)** Ein „*alignment*“ der 12 Nukleobasen 5'- sowie 3'-seitig der 5'-Abbruchstelle zeigte ebenfalls, dass Guanin häufiger als erwartet die erste nicht mehr integrierte L1-Nukleobase ist (Position -1). Außerdem ist die letzte integrierte Nukleobase 5'-verkürzter L1-Insertionen (Position 0) bevorzugt ein Cytosin. **(C)** „*Alignment*“ der 12 Nukleobasen, die beide Seiten der Abbruchstelle am 5'-Ende derjenigen endogenen L1-Elemente flankieren, die an ihren 5'-Enden relativ zu den L1-Referenzsequenzen um mindestens 50 Nukleobasen verkürzt sind (A50, T50, G50 und C50).

Um eine mögliche Verzerrung für zufällige Abbruchstellen in G-reichen Regionen auszuschließen, durch die sich das 5'-Ende der L1-5'-UTR auszeichnet, wurde eine Analyse der 12-Nukleobasensequenzen, welche die Abbruchstellen flankieren nur anhand solcher 5'-verkürzter L1-Elemente wiederholt, die mindestens um 50 Nukleobasen relativ zu den vollständigen L1-Referenzsequenzen (L1.3 bzw. L1.3NZ) verkürzt sind (Abb. 20C). Die relativen Auftretswahrscheinlichkeiten unterscheiden sich nicht bzw. nur marginal von den in Abb. 3.3B dokumentierten, und bestätigen nochmals, dass Guanin als erste fehlende L1-Nukleobase an der 5'-Abbruchstelle (Position -1) sowie Cytosin als endständige L1-Nukleobase (Position 0) weitaus häufiger auftreten, als theoretisch erwartet werden würde. Auch an den Positionen -2 bis -5 treten Guanine mit größerer Wahrscheinlichkeit auf als man erwarten würde.

Um zu prüfen, ob die Nukleotide Desoxycytidin und Desoxyadenosin an den Positionen 0 und +1 auch als Dinukleotid bevorzugt auftreten, wurde das Auftreten aller 16 möglichen Dinukleotide an den 5'-Enden 5'-verkürzter L1-Elemente untersucht (Abb. 21) und auf die theoretische Auftretswahrscheinlichkeit normiert, die sich aus der Nukleotidzusammensetzung der L1-Referenzsequenzen ergibt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 12 Nukleotide, die beide Seiten einer jeden der 885 L1-Abbruchstellen flankieren, auf ihre Dinukleotidzusammensetzung analysiert. An Position -1 und -2 waren die Dinukleotide „AC“ (Abb. 3.4A) sowie „CG“ und „CC“ (Abb. 21D) 1,5- bis 2-fach überrepräsentiert. Noch stärker war jedoch die Überrepräsentation L1-kodierter „CA“-Dinukleotide als endständige L1-Dinukleotide (Position 0 und +1), die das 5'-Ende 5'-verkürzter L1-Elemente darstellten (Abb. 3.4D). Auffallend war auch ein verstärktes Auftreten von „GG“-Dinukleotiden (1,5-fach) an dieser Position (Abb. 21C).

Die im Kapitel 3.2 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, dass Guanin als erste fehlende, L1-kodierte Nukleobase an den 5'-Enden 5'-verkürzter L1-Insertionen überrepräsentiert ist. Dies gilt sowohl für *de novo* L1-Insertionen, die in Zellkulturexperimenten mittels L1-Retrotranspositionsreporterassays generiert wurden, als auch für endogene, genomische L1-Insertionen, die schon seit unzähligen Generationen im humanen Genom manifestiert sind. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass „CA“ häufiger als endständiges Dinukleotid am 5'-Ende 5'-verkürzter L1-Elemente zu finden ist, als man es

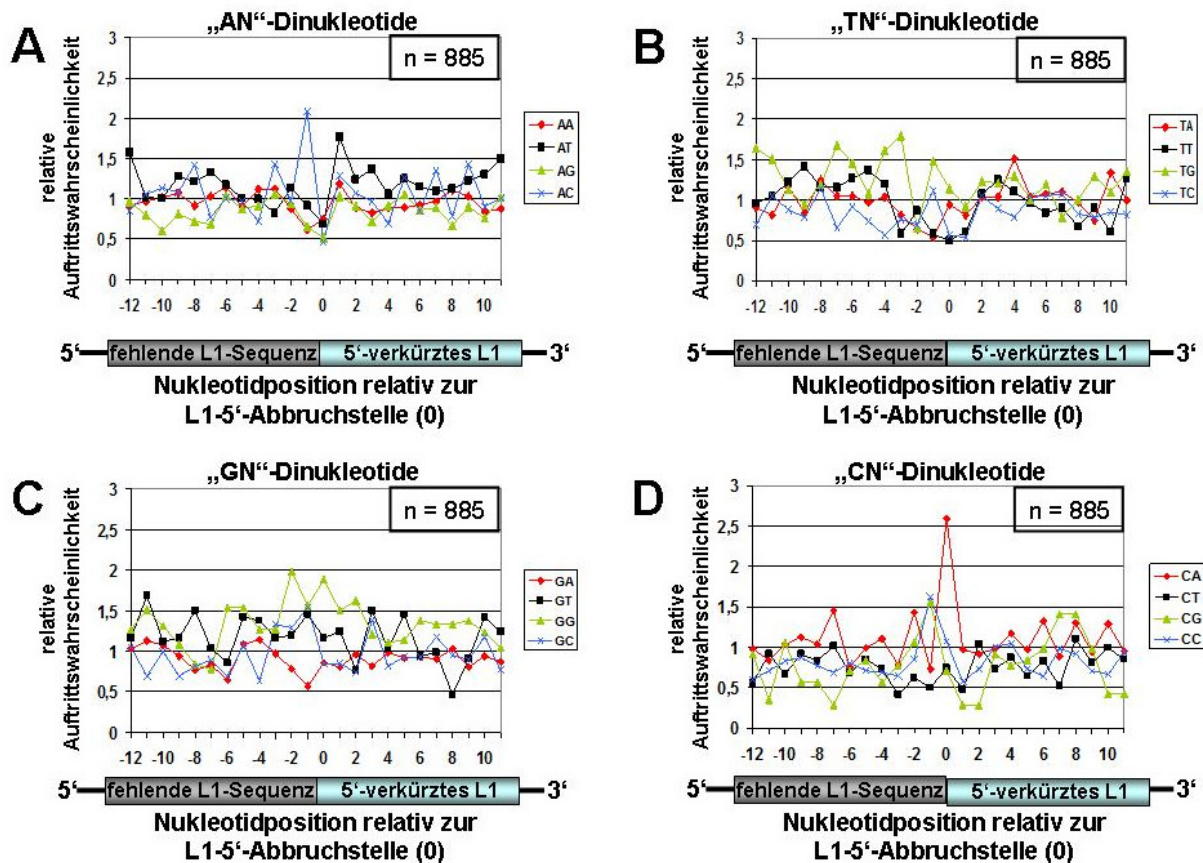


Abbildung 21: Bestimmung der relativen Auftretswahrscheinlichkeit der 16 möglichen Dinukleotidkombinationen innerhalb der L1-Sequenzen, welche die Abbruchstelle 5'-verkürzter genomischer L1-Elemente flankieren. Die Auftretswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Dinukleotidkombinationen wurden für jede L1-kodierte 25 bp-Sequenz ermittelt, die jede 5'-Abbruchstelle umgeben. Position 0 definiert das endständige L1-Nukleotid am 5'-Ende der Insertionen. Die Diagramme zeigen die relativen Auftretswahrscheinlichkeiten der Dinukleotide „AN“ (A), „TN“ (B), „GN“ (C) und „CN“ (D) innerhalb des 25-Nukleotidfensters. Die Dinukleotide „AC“, „CG“ und „CC“ (Position -1) sind als an die Abbruchstelle angrenzende, nicht mehr integrierte L1-Nukleotide überrepräsentiert. Unmittelbar am 5'-Ende der L1-Insertionen liegt das endständige „CA“-Dinukleotid 2,5-fach häufiger vor als theoretisch erwartet. Die Zahlen auf der x-Achse geben jeweils die Positionen des 5'-Nukleotids innerhalb des jeweiligen Dinukleotids wieder.

aufgrund seiner Verteilung in der gesamten L1-Sequenz erwarten würde. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Arbeitshypothese, wonach APOBEC3-Proteine die Entstehung funktioneller, vollständiger, retrotransponierter L1-Kopien durch die Deaminierung der naszierenden L1-cDNA hemmen (Abb. 18).

3.3 Bestimmung des inhibitorischen Effekts von APOBEC3-Mutanten auf die L1-Retrotranspositionsaktivität

3.3.1 APOBEC3C-Mutanten mit inaktiver Deaminasedomäne inhibieren die L1-Retrotransposition

APOBEC3-Proteine inhibieren die retrovirale Replikation durch die Deaminierung von Cytosinen in der einzelsträngigen viralen cDNA (Chiu und Greene, 2008). G-zu-A-Hypermutationen in proviraler DNA sind das sichtbare Resultat dieser Reaktion. Essentiell für die Deaminierung ist die Deaminasedomäne, die in jedem APOBEC3-Protein identifiziert wurde. Die Konsensussequenz der konservierten Aminosäuren der Deaminasedomäne lautet: „His-Xaa-Glu-Xaa₂₃₋₂₈-Pro-Cys-Xaa₂₋₄-Cys“ (Abb. 6A). „Xaa“ steht dabei für jede beliebige Aminosäure. Der Glutaminsäurerest wird für die Protonenübertragung während der Deaminierung benötigt. Der Histidinrest, das Prolin sowie die Cysteine sind essentiell für die Koordinierung von Zn^{2+} (Kap. 1.2).

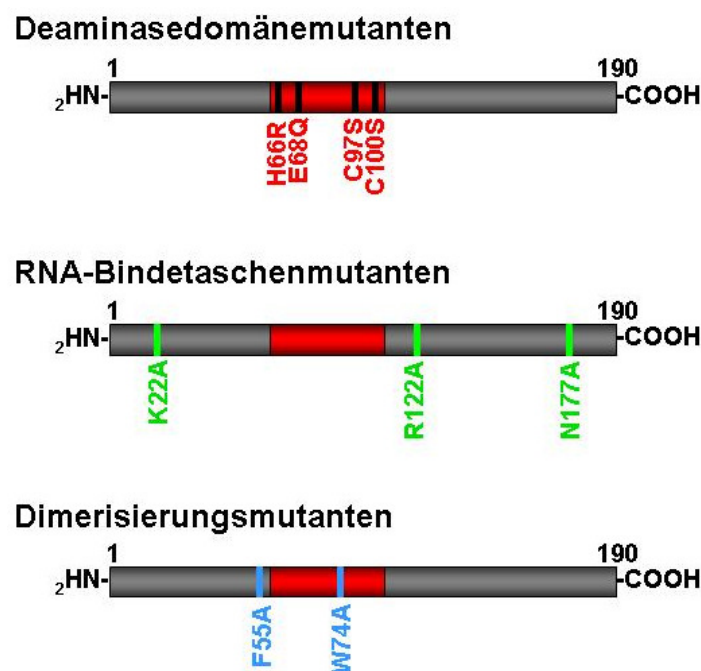


Abbildung 22: Schematische Übersicht der verwendeten A3C-Mutanten. In der A3C-Deaminasedomäne wurden die für die Deaminierung von Cytosinen essentiellen Aminosäuren H66, E68, C97 und C100 mutiert, wobei für die C97S-Mutante in einem *E. coli*-basierten Assay gezeigt wurde, dass sie die *E. coli*-DNA nicht mehr mutieren kann (Stauch *et al.*, 2009). Die Mutationen K22A, R122A und N177A liegen in der Nähe einer RNA-Bindetasche. Die R122A-Mutante ist im Gegensatz zum A3C-WT nicht mehr in der Lage, die 5,8S-RNA zu binden (Stauch *et al.*, 2009). Die Mutationen F55A und W74A führten dazu, dass diese Mutantenproteine keine funktionellen A3C-Dimere bilden können (Stauch *et al.*, 2009).

Da die L1-Replikation ähnlich der retroviralen Replikation über die reverse Transkription eines RNA-Intermediats abläuft, wurde erwartet, dass auch die Hemmung der L1-Retrotransposition durch A3C-Proteine zumindest in einigen Fällen über Deaminierung von Cytosinen in der L1-cDNA stattfindet. Allerdings konnten bisher keine dafür typischen G-zu-A-Hypermutationen in genomischen L1-Sequenzen nachgewiesen werden. Das Ziel der folgenden Arbeiten war es, zunächst den Mechanismus zu klären, über den die Expression von APOBEC3C zu einer Hemmung der L1-Retrotranspositionsrate um ca. 60 – 80 % führt (Bogerd *et al.*, 2006; Muckenfuß *et al.*, 2006). Um die Rolle der Deaminasedomäne in A3C zu prüfen, wurden L1-Retrotranspositionsreporterassays (Kap. 2.3.4) durchgeführt, in denen das L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} (Abb. 10) zusammen mit einem Expressionsplasmid, welches A3C-Wildtyp (WT) oder eine der A3C-Mutanten exprimiert, in HeLa-Zellen kotransfiziert. Um die Auswirkungen von A3C-Wildtyp- und -Mutantenproteinen auf die L1-Retrotranspositionsrate quantifizieren zu können, diente die L1-Retrotranspositionsrate nach einer Kotransfektion des L1-Reporterplasmids mit dem leeren A3C-Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen, Karlsruhe) als Positivkontrolle und wurde als 100 % Retrotranspositionsrate definiert. Um auf eine erfolgreiche Geneticinselektion zu kontrollieren, wurde routinemäßig, in parallel durchgeführten Experimenten das A3C-WT-Expressionsplasmid mit dem L1-Reporterplasmid pJM105 kotransfiziert, das ein inaktiviertes L1-Reporterelement exprimiert (S. 28). Werden die so kotransfizierten Zellen mittels Geneticinzugabe auf Neomycinresistenz selektioniert, so sterben sämtliche Zellen auf der Platte, da keine Neomycinresistenz generierenden L1-Retrotranspositionseignisse stattfinden können. Die Geneticinselektion auf Neomycinresistenz vermittelnde L1-Retrotranspositionseignisse ist dann erfolgreich abgeschlossen, wenn keine Zellen oder Kolonien auf derjenigen Zellkulturplatte überlebt haben, die mit pJM105 kotransfiziert wurde (Abb. 23).

Obwohl die beiden Zinkkoordinierungsmutanten C97S und C100S während des L1-Retrotranspositionsreporterassays schwächer exprimiert wurden als A3C-WT (Abb. 23C), hatten beide Mutanten einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die L1-Retrotranspositionsrate (87 % bzw. 71 %) als A3C-WT (55 %; Abb. 23B). Auch die dritte Zinkkoordinierungsmutante H66R und die Protonenübertragungsmutante E68Q wurden relativ zu A3C-WT ähnlich schwach exprimiert, hemmten jedoch die L1-Retrotransposition ähnlich stark wie A3C-WT (49 % bzw. 44 %; Abb. 23B). Sämtliche Zellextrakte, die für Immunoblotanalysen herangezogen wurden, wurden zwei Tage nach Kotransfektion hergestellt.

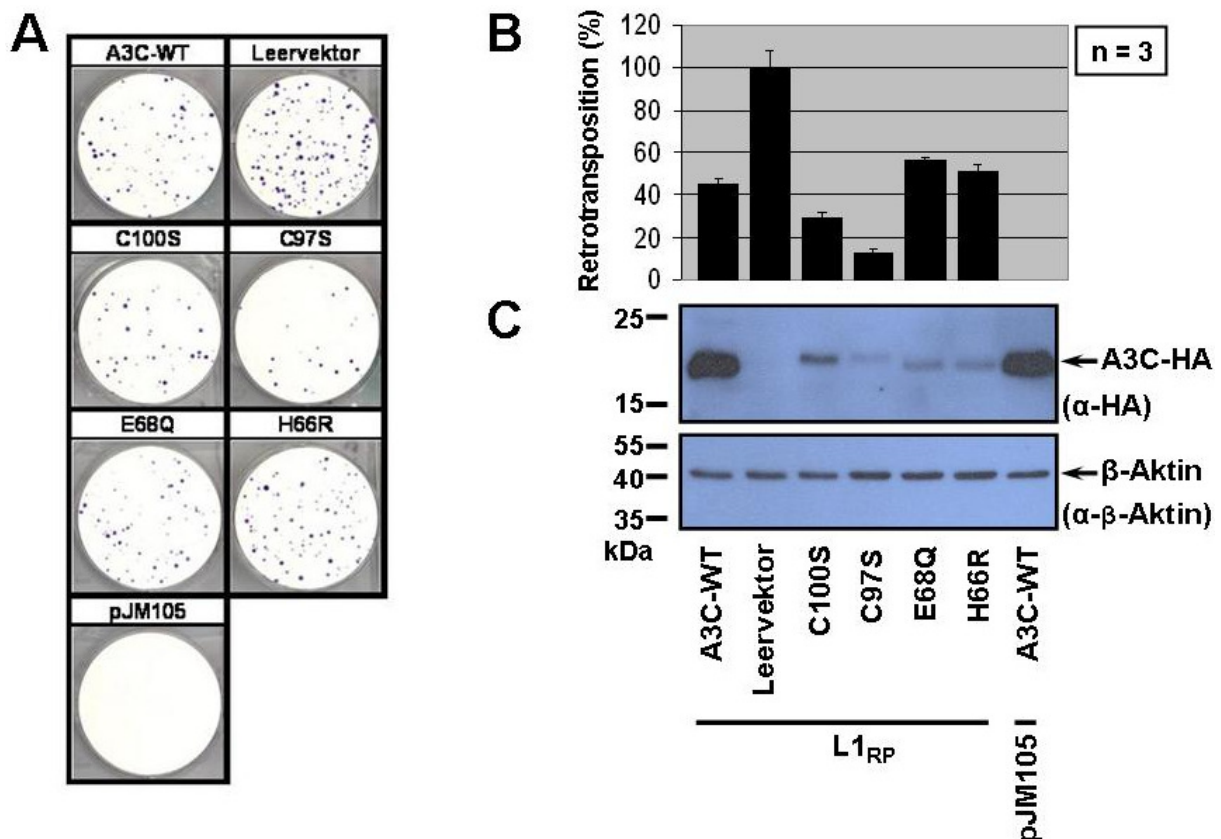


Abbildung 23: APOBEC3C-Mutanten mit inaktiver Deaminasedomäne inhibieren die L1-Retrotransposition. (A) L1-Retrotranspositionsreporterassays in Anwesenheit von A3C-WT bzw. A3C-Mutanten H66R, E68Q, C97S und C100S in HeLa-Zellen. (B) Balkendiagramm zur graphischen Darstellung der Auswirkung der Expression von A3C-Wildtyp und von A3C-Deaminasemutanten auf die L1-Retrotranspositionsrate in HeLa-Zellen. Als Kontrolle auf erfolgreiche Geneticinselektion diente die Kotransfektion des inaktiven L1-Reporters pJM105 mit dem A3C-WT-Expressionsplasmid. (C) Immunoblotanalyse der Zellextrakte der kotransfizierten HeLa-Zellen mit dem α-HA-„tag“-Antikörper zum Nachweis der Expression der A3C-WT- und Mutantenproteine (MW ~ 22 kDa). Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Immunoblotanalyse mit dem α-HA-„tag“-Antikörper wurden 20 µg Zellextrakt von HeLa-Zellen geladen, die in einem früheren Experiment erfolgreich mit A3C-WT transfiziert worden waren. Als Ladekontrolle diente die β-Aktinexpression (MW ~ 42 kDa).

3.3.2 Mutanten der A3C-Deaminasedomäne unterscheiden sich von ihren korrespondierenden A3A-Mutanten in ihrem Einfluß auf die L1-Retrotransposition

Die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse sprechen dafür, dass die enzymatische Aktivität der A3C-Deaminasedomäne für die Inhibition der L1-Retrotransposition nicht essentiell ist. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass Mutationen in der A3A-Deaminasedomäne (E72A, C101A/C106A; Abb. 24) nicht nur deren L1-inhibierenden Effekt beseitigen, sondern sogar eine Steigerung der L1-Retrotranspositionsrate um 50 – 80 % bewirken (Muckenfuß *et al.*, 2006). Da sich sowohl A3A als auch A3C durch nur eine Deaminasedomäne auszeichnen (Abb. 6C), sprechen diese Ergebnisse dafür, dass A3A die L1-Aktivität über einen anderen Mechanismus hemmt als A3C und dass hierfür die enzymatische Aktivität der Cytidineaminasedomäne essentiell

ist. Um diese ersten Ergebnisse zu untermauern, wurden die Effekte der korrespondierenden Mutanten von A3A (E72A, C101A/C106A) und A3C (E68Q, C97S/C100S) auf die L1-Retrotranspositionsrate in parallel durchgeführten L1-Retrotranspositionsreporterassays untersucht (Abb. 25). Die E72A- bzw. E68Q-Mutation betrifft den Glutaminsäurerest, der für die Protonenübertragung bei der Deaminierungsreaktion essentiell ist. Die beiden Doppelmутanten C101A/C106A bzw. C97S/C100S zeichnen sich jeweils durch die Mutation der für die Zn^{2+} -Koordinierung essentiellen Cysteine aus.

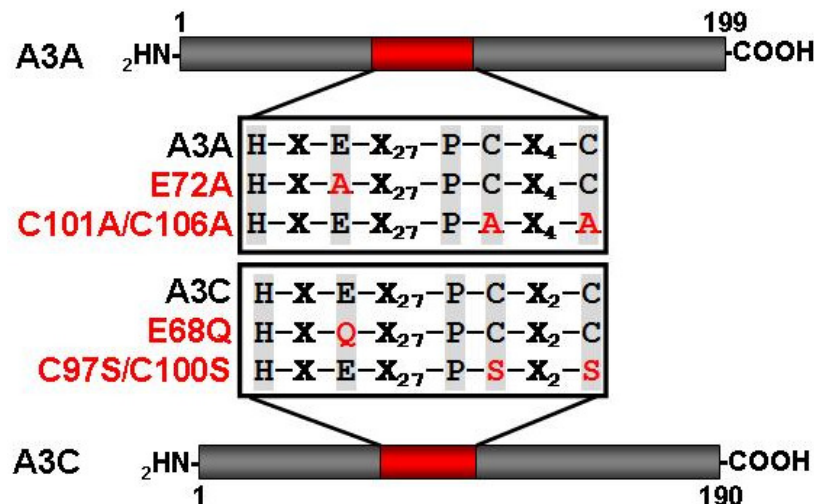


Abbildung 24: Übersicht der korrespondierenden A3A- bzw. A3C-Deaminasedomänenmutanten. In den Mutanten A3A-E72A und A3C-E68Q ist der Glutaminsäurerest mutiert, der für die Protonenübertragung bei der Deaminierung essentiell ist. A3A-C101A/C106A und A3C-C97S/C100S besitzen eine Doppelmутation der beiden für die Zn^{2+} -Koordinierung wichtigen Cysteine. Grau unterlegt sind die konservierten Aminosäuren der Deaminasedomäne. „X“ steht für jede beliebige Aminosäure.

Die Expressionsplasmide der A3A- und A3C-Mutanten wurden jeweils mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} in HeLa-Zellen kotransfiziert und in L1-Retrotranspositionsreporterassays auf ihre Auswirkungen auf die L1-Aktivität untersucht (Kap. 2.3.4). Als Positivkontrolle für einen erfolgreich durchselektionierten L1-Retrotranspositionsreporterassay diente die Kotransfektion von pJM101/L1_{RP} mit dem A3-Leervektor pcDNA3.1/Zeo(+), der als Expressionsvektor für die unterschiedlichen A3-Gene und –Mutanten diente. Die resultierende Retrotranspositionsrate diente als Bezugsgröße für die übrigen Retrotranspositionsassays und wurde als 100 % definiert (Abb. 25B). Als weitere Kontrolle für eine erfolgreiche Geneticinselektion wurden das A3A-Expressionsplasmid sowie das L1-Reporterplasmid pJM105, welches für ein weitestgehend inaktiviertes L1-Reporterelement kodiert, kotransfiziert und mittels Geneticinselektion auf neomycinresistente Zellen selektioniert. Jedes Kotransfektionsexperiment wurde in 6-facher Ausführung angesetzt (Abb. 25).

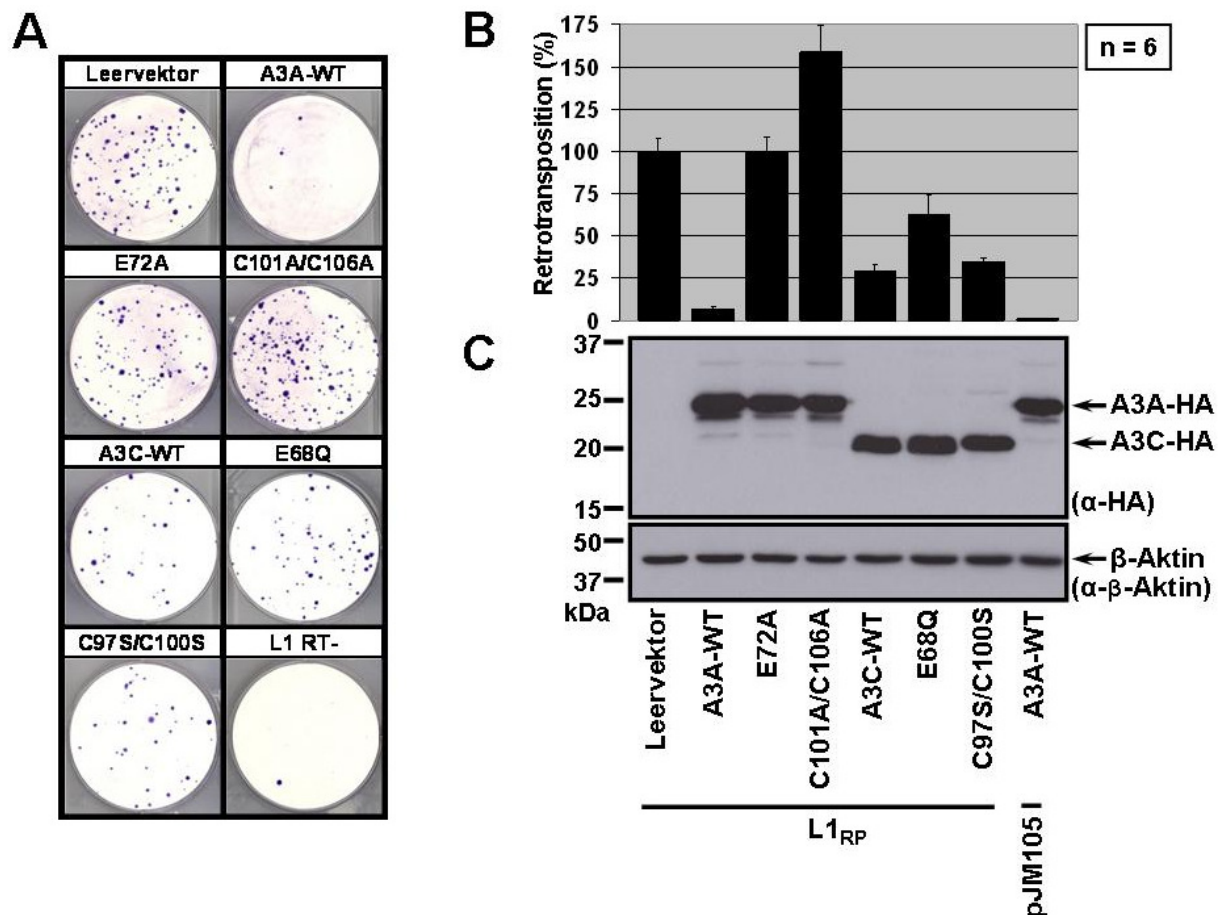


Abbildung 25: A3C-Deaminasedomänenmutanten und ihre korrespondierenden A3A-Mutanten haben gegensätzliche Auswirkungen auf die L1-Retrotranspositionsrate. (A) Genetizinresistente HeLa-Kolonien, die aus der Kotransfektion eines L1-Reporterplasmids und je einem A3A- bzw. A3C-Expressionsplasmid sowie der anschließenden Selektion mit Geneticin entstanden. (B) Effekte von A3A-WT, A3C-WT und korrespondierenden A3A- bzw. A3C-Deaminasedomänenmutanten auf die L1-Retrotranspositionsaktivität in HeLa-Zellen. (C) Immunoblotanalyse der Zellextrakte der kotransfizierten HeLa-Zellen mit dem α-HA-„tag“-Antikörper zum Nachweis der Expression der A3A-WT-, A3C-WT- und Mutantenproteine (A3C MW ~ 22 kDa; A3A MW ~ 25 kDa). Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Immunoblotanalyse mit dem α-HA-„tag“-Antikörper wurden 20 µg Zellextrakt von solchen HeLa-Zellen geladen, die in früheren Experimenten mit dem A3A-WT-Expressionsplasmid transfiziert worden waren und nachweislich HA-markiertes A3A exprimierten. Als Ladekontrolle diente die β-Aktinexpression (MW ~ 42 kDa).

Die Immunoblotanalyse in Abbildung 25C zeigte, dass A3A-WT, A3C-WT und alle transfizierten Mutanten in nahezu identischen Mengen exprimiert wurden. Während A3A-WT und A3C-WT die L1-Retrotransposition um 94 % bzw. 71 % hemmten, hob die E72A-Mutation der Protonenübertragungsmutante den inhibitorischen Effekt von A3A-WT vollständig auf (Abb. 25A, B). Im Gegensatz dazu reduzierte A3C-E68Q die Retrotranspositionsrate immer noch um 37 %. Auch im Falle der beiden Cysteindoppelmutanten C101A/C106A (A3A) und C97S/C100S (A3C) waren die Ergebnisse gegensätzlich: Während die A3A-Doppelmutante nicht nur den inhibitorischen Effekt aufhob, sondern sogar eine Steigerung der Retrotranspositionsrate um ca. 59 % bewirkte, hemmte die korrespondierende A3C-Doppelmutante die Retrotranspositionsrate noch immer um 66 % (Abb. 25A, B). Während damit die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Effekte von A3C-WT und

seinen Mutantenproteinen sowie der kürzlich publizierte Effekt der A3A-Doppelmutante (Muckenfuß *et al.*, 2006) bestätigt werden konnten, wick nur der hier beobachtete Effekt der A3A-E72A-Mutante vom kürzlich publizierten Effekt (+ 40 %; Muckenfuß *et al.*, 2006) ab. Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte auf die HeLa-Zellen zurückzuführen sein, in denen die L1-Retrotranspositionsreporterassays durchgeführt wurden. Die für diese Versuche verwendeten HeLa-Zellen stammten im Gegensatz zu den in Muckenfuß *et al.* (2006) benutzten von einer sehr viel früheren Passage ab, so dass Unterschiede in der Expression möglicher für die Aktivität der A3-Proteine benötigter Kofaktoren auftreten können.

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 zeigten, dass eine funktionelle Deaminasedomäne essentiell für die Inhibierung der L1-Retrotransposition durch A3A ist. Diese Ergebnisse wären konsistent mit einer Hemmung der nachweisbaren L1-Retrotranspositionsrate mittels Deaminierung von Cytosinen in der L1-cDNA durch A3A über den in meiner Arbeitshypothese (Kap. 3.1) beschriebenen Mechanismus. Im Gegensatz zu den A3A-Mutanten inhibierten korrespondierende, deaminierungsdefiziente A3C-Mutanten die L1-Retrotransposition noch immer. Das bedeutet, dass A3C die L1-Aktivität nicht entsprechend unserer Arbeitshypothese durch eine Deaminierung der L1-cDNA hemmt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass A3A und A3C, die sich beide durch eine einzelne Deaminasedomäne auszeichnen, die L1-Retrotransposition durch unterschiedliche Mechanismen inhibieren.

3.3.3 Die A3C-Mutante R122A, die sich durch eine inaktivierte RNA-Bindetasche auszeichnet, hemmt die L1-Retrotransposition nicht

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die A3C-vermittelte Hemmung von L1 auf einer Interaktion von A3C mit RNA bzw. DNA beruht. Basierend auf einem dreidimensionalen Proteinmodell wurde kürzlich eine RNA-Bindetasche in A3C identifiziert (Stauch *et al.*, 2009). Mutationen in unmittelbarer Nähe dieser Bindetasche (Abb. 26) hatten folgende Konsequenzen: Sowohl A3C-WT als auch die Mutanten K22A und N177A inhibieren SIV_{agm}Δ*vif*. Im Gegensatz dazu kann die Mutante R122A SIV_{agm}Δ*vif* nicht hemmen. Dieser Verlust des inhibierenden Effekts beruht auf der Mutation der RNA-Bindetasche, wodurch die R122A-Mutante nicht mehr in der Lage ist, an RNA zu binden. Damit wird das Verpacken in SIV_{agm}Δ*vif*-Partikel und damit einhergehend die antivirale Wirkung verhindert. Um die Konsequenzen dieser Mutationen für die A3C-vermittelte Hemmung von L1 zu bestimmen, wurden die drei Mutanten nach jeweiliger Kotransfektion ihrer Expressionplasmide mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} in L1-Retrotranspositionsreporterassays (Kap. 2.3.4) untersucht. Jeder Ansatz wurde in 6-facher Ausfertigung durchgeführt (Abb. 26).

Sowohl von A3C-WT als auch von den Mutanten K22A und N177A wurden vergleichbare Proteinmengen exprimiert (Abb. 26D). Da A3C-WT und alle seine Mutantenproteine an ihren C-terminalen Enden mit einem HA-„tag“ versehen wurden, können sie mit Hilfe eines α -HA-Antikörpers detektiert werden. Während die N177A-Mutante die L1-Retrotransposition ähnlich stark hemmt (53 %) wie A3C-WT (62 %), betrug die Hemmung durch die K22A-Mutante nur noch 29 % (Abb. 26B, C). Im Gegensatz dazu führte die extrem schwache Expression der R122A-Mutante nicht nur zu einer Aufhebung des L1-inhibierenden Effekts von A3C, sondern sogar zu einer Steigerung der Retrotranspositionsrate um 63 %.

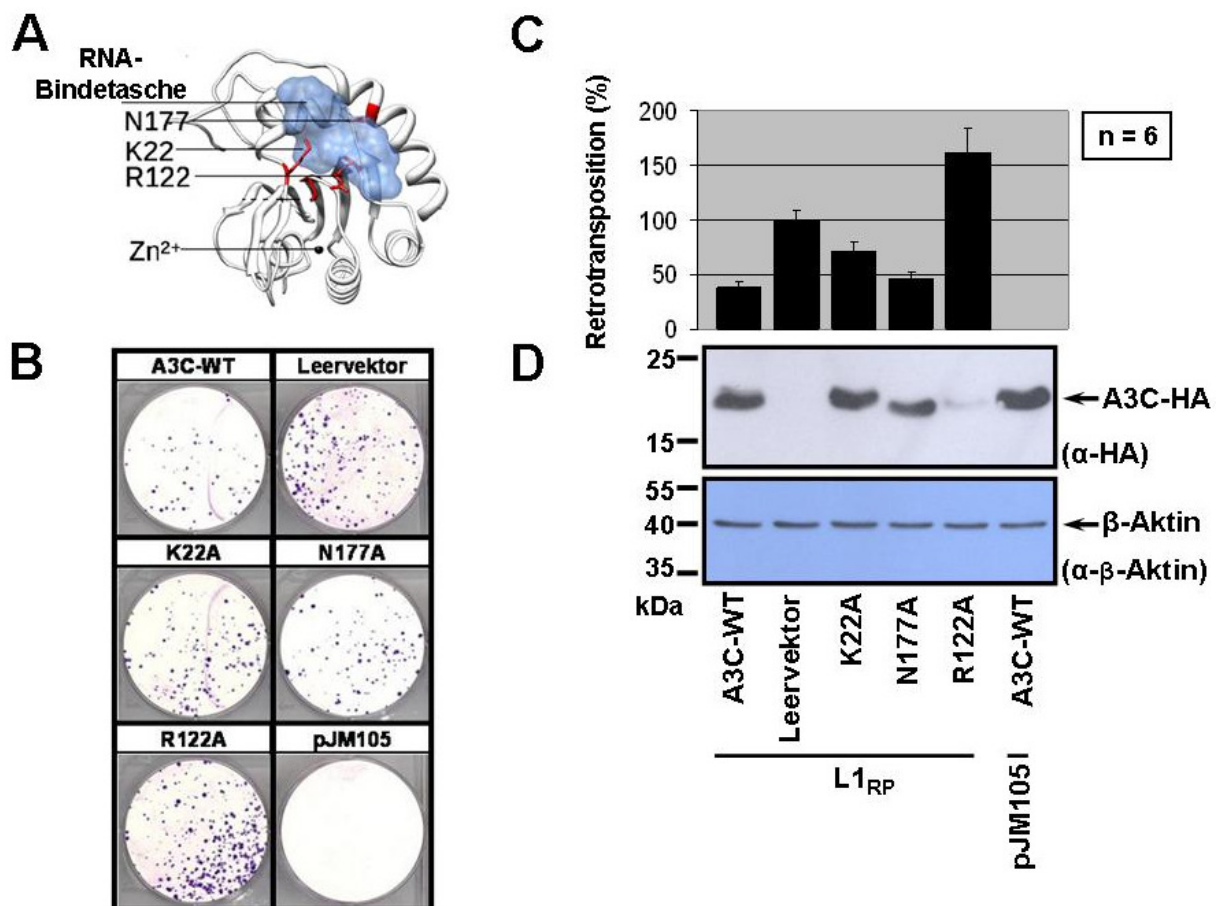


Abbildung 26: Effekte der A3C-RNA-Bindetaschenmutanten K22A, R122A und N177A auf die L1-Retrotranspositionsrate. (A) Drei A3C-Mutantenproteine (K22A, R122A und N177A) mit Punktmutationen in der Nähe der A3C-RNA-Bindetasche (aus Stauch *et al.*, 2009). (B) L1-Retrotranspositionsreporterassay in Anwesenheit von A3C-WT und von unterschiedlichen A3C-Mutantenproteinen (K22A, R122A, N177A). Die Kotretransfektion von pJM105 und A3C-WT-Expressionsplasmid diente als Kontrolle für erfolgreiche Selektion. (C) L1-Retrotranspositionsraten in HeLa-Zellen sowie in Anwesenheit von A3C-WT bzw. A3C-Mutanten. Ein weiterer Ansatz aus kotretransfizierten L1-Reporter pJM101/L1_{RP} und dem leeren A3-Expressionsplasmid pcDNA3.1/Zeo(+) diente als Maß für die L1-Retrotransposition ohne exprimiertes APOBEC3-Protein (100 %). (D) Immunoblotanalyse der Expression der A3C-WT- und Mutantenproteine (MW ~ 22 kDa) in 20 μ g Zellextrakten von kotretransfizierten HeLa-Zellen mit dem α -HA-„tag“-Antikörper. Die Expression von β -Aktin (MW ~ 42 kDa) diente als Ladekontrolle.

Der inhibitorische Effekt von A3C-WT sowie der N177A-Mutante auf die SIV_{agm} Δ vif-Replikation (~ 60 – 84-fach; Stauch *et al.*, 2009) stimmen in etwa überein. Damit vergleichbar

war die Beobachtung, dass A3C-WT und die N177A-Mutante ähnliche inhibitorische Effekte auf die L1-Retrotransposition ausübten (~ 62 % bzw. ~ 53 %). Während die K22A-Mutante die SIV_{agm}Δ*vif*-Replikation genauso hemmte wie A3C-WT, war ihr inhibitorischer Effekt auf die L1-Retrotransposition abgeschwächt (~ 29 % im Gegensatz zu ~ 62 %). Der Effekt der R122A-Mutante, der zu einer Aufhebung der A3C-vermittelten Hemmung der L1-Retrotransposition führte, war vergleichbar mit der Aufhebung des die SIV_{agm}Δ*vif*-Replikation hemmenden Effekts von R122A (Stauch *et al.*, 2009). Wegen der schwachen Expression der R122A-Mutante (Abb. 26D) konnten aus diesem Experiment aber keine eindeutigen Schlüsse auf den Effekt dieser Mutation auf die L1-inhibierenden Eigenschaften von A3C gezogen werden. Daher sollten im nächsten Experiment in L1-Retrotranspositionsreporterassays zunehmende Mengen an R122A-Expressionplasmid mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} kotransfiziert werden, um den Effekt dieser Mutante zu titrieren (Abb. 3.9). Zu diesem Zweck wurden 0,1 bis 1 µg R122A-Expressionsplasmid mit jeweils 0,5 µg L1-Reporterplasmid kotransfiziert. Um die Gesamtmenge an transfizierter Plasmid-DNA konstant zu halten, wurde mit dem A3C-Leervektor pcDNA3.1/Zeo(+) jeweils auf eine Gesamtmenge an transfizierter Plasmid-DNA von 1,5 µg aufgefüllt. Die L1-Retrotranspositionsrate, die sich in L1-Retrotranspositionsreporterassays aus der Kotransfektion von 0,5 µg L1-Reporterplasmid und 1 µg A3C-Leervektor pcDNA3.1/Zeo(+) ergab, wurde gleich 100 % gesetzt (Abb. 3.9). Um den Effekt der R122A-Mutante mit dem L1-inhibierenden Effekt von A3C-WT vergleichen zu können, wurde in einem Kontrollexperiment je 0,5 µg L1-Reporterplasmid, A3C-WT-Expressionsplasmid und pcDNA3.1/Zeo(+) kotransfiziert und dem L1-Retrotranspositionsreporterassay unterzogen. Sämtliche Ansätze wurden 6-fach parallel durchgeführt.

In der Immunoblotanalyse war sowohl das 22 kDa-A3C-Wildtypprotein nachweisbar als auch die Expression der R122A-Mutante in HeLa-Zellen, die mit 0,5 µg, 0,75 µg und 1 µg Expressionplasmid transfiziert wurden (Abb. 27C). Während A3C-WT die L1-Aktivität um 41 % hemmte, war nach Transfektion mit 0,1 µg und 0,25 µg A3C-R122A-Expressionsplasmid weder Mutantenprotein noch eine signifikante Hemmung der L1-Retrotranspositionsrate nachweisbar. Im Gegensatz dazu führte die Kotransfektion mit 0,5 µg und 0,75 µg Expressionplasmid zu nachweisbaren Mengen an R122A-Mutantenprotein und nicht nur zur Aufhebung des L1-inhibierenden Effekts von A3C, sondern auch zu einer Steigerung der L1-Retrotranspositionsrate im Vergleich zum A3C-Leerplasmid um 65 % bzw. 48 % (Abb. 27A, B). Diese Ergebnisse bestätigten die sich in Abb. 3.8 abzeichnende Beobachtung, wonach die R122A-Mutante nicht nur die L1-Hemmung durch A3C aufhebt, sondern die L1-Retrotransposition unterstützt und um 63 % steigern kann. Die Kotransfektion von 1 µg A3C-R122A-Expressionsplasmid (Abb. 27C) führte zu einer Expression der Mutantenproteine,

deren Menge ~ 35 % der A3C-WT-Proteinmenge betrug (Abb. 27C), und noch immer eine Steigerung der L1-Aktivität um 10 % erreichte (Abb. 27B).

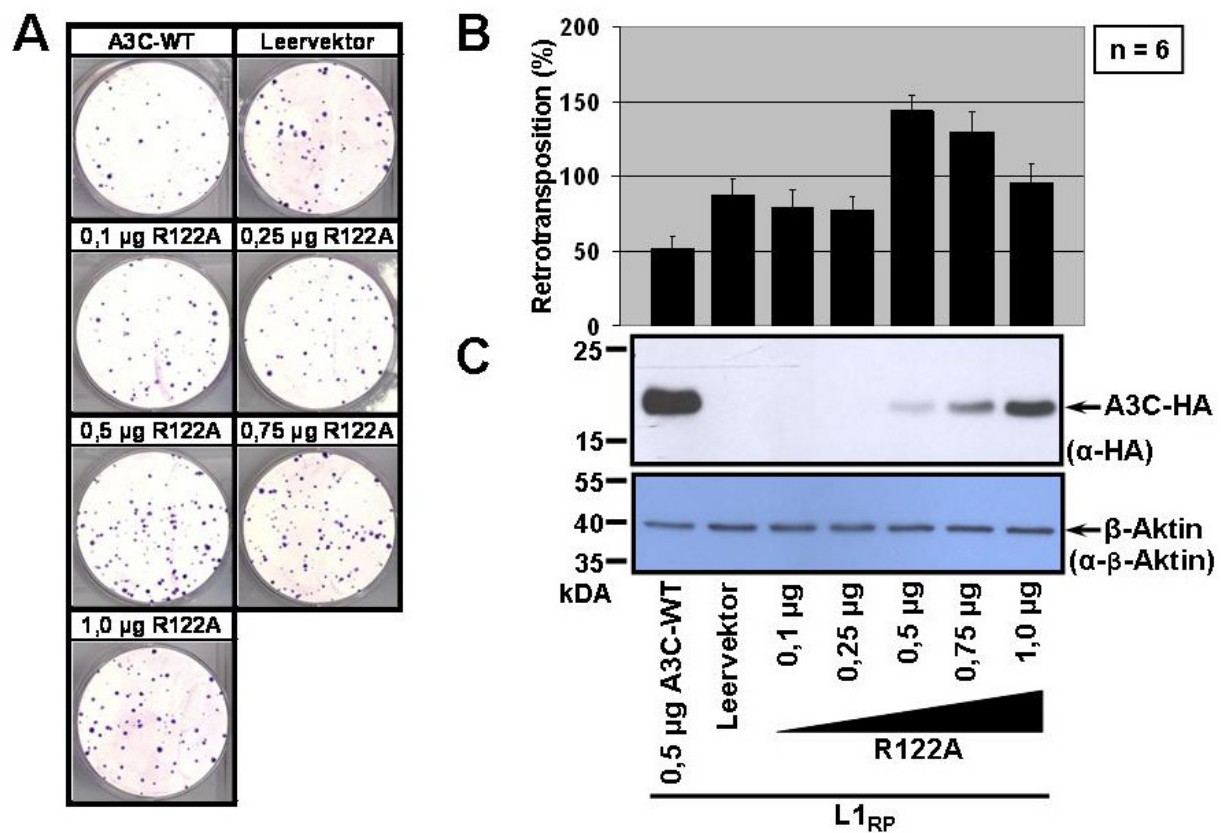


Abbildung 27: Auswirkungen der Titration des A3C-R122A-Expressionsplasmids auf die L1-Retrotranspositionsrate. Die Mutation R122A in der RNA-Bindetasche von A3C hob nicht nur die A3C-vermittelte L1-Inhibition auf, sondern steigerte die L1-Retrotranspositionsrate um bis zu 75 %. **(A)** L1-Retrotranspositionsreporterassay in HeLa-Zellen. 0,5 µg L1-Reporterplasmid wurden mit zunehmenden Mengen an A3C-R122A-Expressionsplasmid kotransfiziert. Jeder Kotransfektionsansatz wurde mit pcDNA3.1(+) jeweils auf 1,5 µg Gesamtmasse an DNA aufgefüllt. Als Vergleich mit der L1-Inhibition durch A3C-WT diente ein Ansatz, in dem 0,5 µg L1-Reporterplasmid mit je 0,5 µg A3C-WT-Expressionplasmid und APOBEC-Leervektor kotransfiziert wurden. **(B)** Einfluß der Expression verschiedener Mengen an R122A-Expressionsplasmid auf die L1-Retrotranspositionsrate. Die L1-Retrotranspositionsrate des Ansatzes aus 0,5 µg L1-Reporterplasmid und kotransfiziertem 1 µg APOBEC-Leervektor wurde als 100 % Retrotransposition definiert. **(C)** Analyse der Expression der A3C-WT- und A3C-R122A-Proteine (MW ~ 22 kDa) in 20 µg Zelleextrakt mittels Immunoblotanalyse mit einem α-HA-„tag“-Antikörper. Als Ladekontrolle diente die β-Aktinexpression (MW ~ 42 kDa).

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente zeigten, dass die beiden A3C-RNA-Bindetaschenmutanten K22A und N177A die L1-Retrotransposition hemmen können. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante R122A keinerlei hemmenden sondern sogar einen L1-aktivitätsfördernden Effekt. Diese Steigerung der L1-Retrotranspositionsrate in Anwesenheit von A3C-R122A konnte in einer Titration des Effekts dieser Mutante auf die L1-Aktivität reproduziert werden. Die Transfektion von 0,1 bzw. 0,25 µg R122A-Expressionsplasmid führte nicht zu nachweisbaren Mutantenproteinmengen (Abb. 27C), was vermutlich erklärt, warum keinerlei aussagekräftiger Effekt auf die L1-Retrotranspositionsrate zu beobachten war (Abb. 27B). Dass die RNA-Bindetaschenmutante R122A die L1-Retrotransposition nicht

hemmte, ist konsistent mit den Ergebnissen von Stauch, Hofmann *et al.* (2009), die zeigten, dass R122A die Replikation von SIV_{agm}Δvif nicht mehr hemmen kann. Als Ursache dafür wurde die fehlende Fähigkeit der R122A-Mutante zur Bindung von RNAs identifiziert. Deshalb sprechen die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3 dafür, dass eine Interaktion zwischen A3C und einer RNA essentiell für die Inhibierung der L1-Retrotransposition ist. Der L1-fördernde Effekt der R122A-Mutante könnte dadurch erklärt werden, dass R122A-Mutantenproteine auch Dimere mit den endogen in HeLa-Zellen exprimierten A3C-WT-Proteinen bilden (Muckenfuß *et al.*, 2006; Stauch *et al.*, 2009). Diese R122A/WT-Dimere könnten dann vermutlich keine RNAs mehr binden und wären dadurch inaktiv. Die Konsequenz der Inaktivierung endogen exprimierter A3C-Proteine ist eine erhöhte L1-Retrotransposition.

3.3.4 Dimerisierungsdefiziente APOBEC3C-Mutanten hemmen die L1-Retrotransposition nicht

Anhand von A3C-Mutanten, die mit Hilfe eines 3D-Proteinmodells generiert wurden, konnten kürzlich Dimerisierungsdomänen in A3C identifiziert werden (Stauch *et al.*, 2009). Mit Hilfe der Dimerisierungsmutanten F55A, W74A und K51A (Abb. 28A) konnte gezeigt werden, dass A3C nur als Dimer die Replikation von SIV_{agm}Δvif hemmen kann (Stauch *et al.*, 2009). Da die Mutation K51A die Dimerisierung von A3C nicht beeinflusste, wurde diese Mutante von den Experimenten ausgeschlossen. Um zu untersuchen, ob A3C nur als Dimer L1 hemmen kann, wurden die Expressionsplasmide der beiden A3C-Dimerisierungsmutanten F55A und W74A sowie von A3C-WT jeweils mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} in HeLa-Zellen kotransfiziert. Im sich anschließenden L1-Retrotranspositionsreporterassay wurde der Effekt der A3C-Dimerisierungsmutanten auf die L1-Aktivität quantifiziert (Abb. 28). Die L1-Retrotranspositionsrate, die sich im L1-Reporterassay aus der Kotransfektion von L1-Reporterplasmid und pcDNA3.1/Zeo(+) ergab, wurde als 100 % definiert. Jede einzelne der Mutationen F55A und W74A für sich führte zur Aufhebung des L1-inhibierenden Effekts von A3C-WT, welches in diesem Experiment die L1-Retrotranspositionsrate um 71 % verringerte (Abb. 28B, C).

Die Ergebnisse zeigten, dass zwei A3C-Moleküle dimerisieren müssen, um die L1-Retrotransposition hemmen zu können. Diese nicht vorhandene L1-Inhibierung der A3C-Dimerisierungsmutanten F55A und W74A ist konsistent mit den Daten aus Stauch *et al.* (2009). Da für A3G gezeigt wurde, dass die Oligomerisierung von der Bindung an eine RNA abhängt (Huthoff *et al.*, 2009), sind die Ergebnisse dieses Kapitels konsistent mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.3 und sprechen dafür, dass A3C mit Hilfe einer RNA dimerisieren bilden muß, um die L1-Retrotransposition zu hemmen.

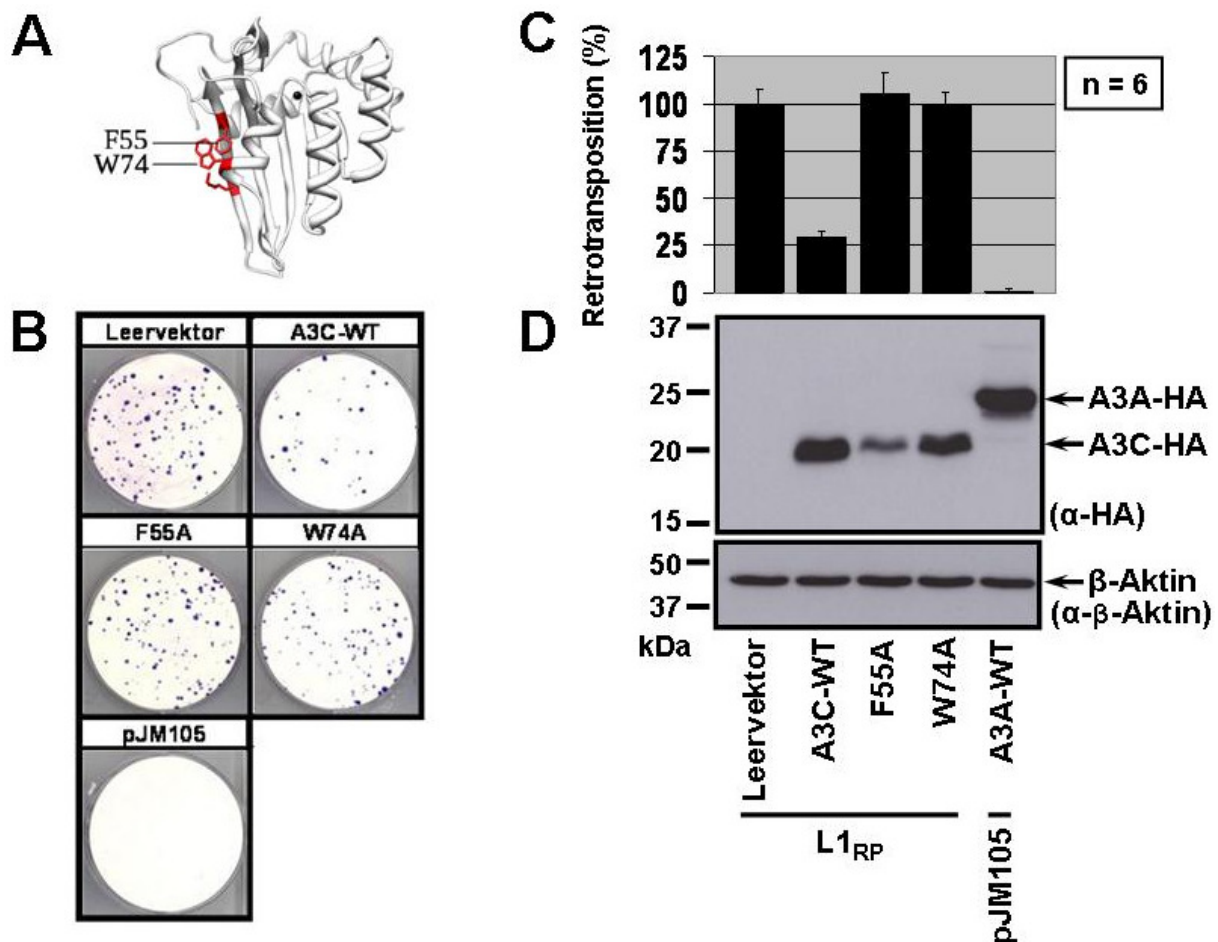


Abbildung 3.28: Effekte der A3C-Dimerisierungsmutanten auf die L1-Retrotranspositionsrate. Dimerisierungsdefiziente A3C-Mutanten hemmen die L1-Retrotransposition nicht. **(A)** Schematische Darstellung der Lokalisation der Aminosäureaustausche der beiden A3C-Dimerisierungsmutanten F55A und W74A (aus Stauch *et al.*, 2009). **(B)** L1-Retrotranspositionsreporterassay in HeLa-Zellen unter Anwesenheit der Expressionsplasmide beider Dimerisierungsmutanten sowie von A3C-WT. **(C)** L1-Retrotranspositionsraten in Anwesenheit von A3C-WT bzw. A3C-Dimerisierungsmutanten. Die Retrotranspositionsrate nach Kotransfektion von L1-Reporterplasmid und dem leeren APOBEC-Expressionsplasmid pcDNA3.1/Zeo(+) wurde als 100 % gesetzt. Jeder Assay erfolgte in sechs Parallelansätzen. **(D)** Immunoblotanalyse zum Nachweis der Expression von A3C-WT (MW ~ 22 kDa) bzw. von A3C-Mutanten in 20 µg Zellextrakt mittels α-HA-„tag“-Antikörper. Als Ladekontrolle diente die β-Aktinexpression (MW ~ 42 kDa).

3.4 Der Einfluß von APOBEC3-Proteinen auf die Ausdehnung von *de novo* L1-Insertionen

Das in Kapitel 3.1 vorgestellte Arbeitsmodell der L1-Inhibierung durch APOBEC3-Proteine mittels Editierung der L1-cDNA unter Beteiligung von BER-Enzymen besagt, dass bei Anwesenheit und Abwesenheit von APOBEC3-Proteinen zwar die gleiche Anzahl an L1-Retrotranspositionseignissen stattfindet, dass jedoch *de novo* L1-Insertionen, die in Anwesenheit von A3-Proteinen generiert wurden, stärker verkürzt vorliegen (Abb. 18). Um ein *de novo* L1-Retrotranspositionseignis im L1-Retrotranspositionsreporterassay

nachweisen zu können, muß die Insertion wenigstens die gesamte Neomycin-Phosphotransferase-Reporterkassette am 3'-Ende umfassen (Abb. 16). Stärker verkürzte L1-Kopien vermitteln der Zelle keine Resistenz gegenüber einer Antibiotikaselektion. Es sollte geprüft werden, ob die bei A3-Anwesenheit reduzierte Anzahl an *de novo* L1-Retrotranspositionseignissen auf eine Zunahme an verkürzten L1-Insertionen zurückzuführen ist, mit der auch eine Zunahme an verkürzten und damit defekten *neo*-Kassetten verbunden wäre. Wenn in Anwesenheit eines A3-Proteins die gleiche Anzahl an L1-3'-Enden detektierbar wäre wie in einem Vergleichsansatz ohne exprimiertes A3, würde das die Arbeitshypothese bestätigen. Sind bei Anwesenheit von A3-Proteinen weniger *de novo* L1-3'-Enden erzeugt worden als in einem Vergleichsansatz ohne exprimiertes A3-Protein, so könnten die Ursachen darin liegen, dass aufgrund der A3-Aktivität entweder weniger L1-Integrationsereignisse stattfinden oder die Integrationsereignisse so stark verkürzt sind, dass ihr Nachweis mittels PCR-Analyse mit L1-spezifischen „Primern“ nicht mehr möglich ist.

Es sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von A3C beim L1-Retrotranspositions Vorgang Einfluß hat auf die Ausdehnung resultierender *de novo* L1-Insertionen. Zu diesem Zweck wurden 10 mal 2×10^5 HeLa-Zellen mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} und dem A3C-Expressionsplasmid kotransfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen eines A3C-Kotransfektionsansatzes lysiert, und das Zelllysate wurde in einer Immunoblotanalyse auf die Anwesenheit von A3C kontrolliert (Abb. 29C). Die Zellen der neun verbliebenen Ansätze wurden ab dem ersten Tag nach der Transfektion durch Zugabe von Geneticin auf L1-Retrotranspositionseignisse selektioniert (Kap. 2.3.4). 12 Tage nach der Transfektion war der Selektionsprozess abgeschlossen und die entstandenen HeLa-Kolonien von drei Ansätzen wurden fixiert, gefärbt und ausgezählt. So konnte auch auf die durchschnittliche Kolonienzahl der verbliebenen sechs Ansätze geschlossen werden. Die Kolonien, die aus diesen sechs Ansätzen hervorgingen, wurden trypsiniert, zu einem einzigen Ansatz vereinigt und miteinander vermischt, erneut ausplattiert und für weitere sieben Tage unter Geneticinselektion inkubiert. Es folgte die Isolierung der genomischen DNA aus jeder der beiden Mischpopulationen von HeLa-Zellen (Abb. 29A). Aus den Ansätzen mit kotransfiziertem L1-Reporterplasmid und A3C-Expressionplasmid wurden 798 Kolonien in einem Ansatz vereinigt. In dem Vergleichsansatz mit kotransfiziertem L1-Reporterplasmid und dem leeren APOBEC-Expressionplasmid pcDNA3.1/Zeo(+) wurden aus drei Ansätzen 846 HeLa-Kolonien vereinigt. Damit standen für die weiteren Arbeiten zwei Mischpopulationen aus jeweils etwa 800 *de novo* L1-Insertionen zur Verfügung. Das Vereinigen einer großen Anzahl an *de novo* L1-Insertionen war notwendig, um die folgende Inkubationszeit bis zum Erreichen einer für die Isolation genomischer DNA ausreichenden Anzahl an Zellen möglichst kurz zu halten. Dadurch sollte verhindert werden, dass einige

wenige Klone aufgrund von Wachstumsvorteilen die anderen Klone aus den Mischpopulationen verdrängen und dadurch die Ergebnisse verzerren.

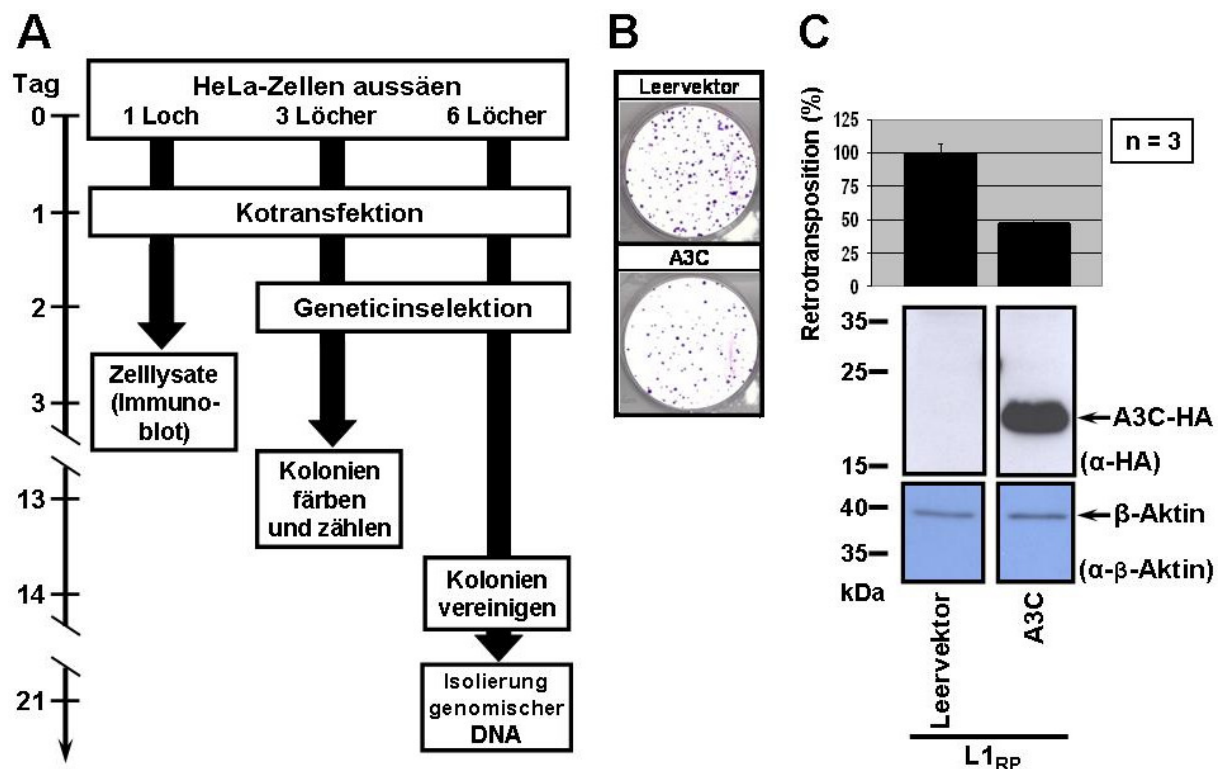


Abbildung 29: Herstellung von *de novo* L1-Insertionen in der Gegenwart von überexprimiertem A3C zur anschließenden Analyse ihrer 3'-Enden. (A) Schematische Übersicht zum experimentellen Ablauf. Es wurden jeweils zehnmal 2×10^5 HeLa-Zellen in Vertiefungen von 6-Lochplatten ausgesät und mit pJM101/L1_{RP} sowie dem A3C-Expressionsplasmid oder dem Leervektor pcDNA3.1/Zeo kotransfiziert. Jeweils ein Ansatz der jeweils zehn Kotransfektionen wurde zwei Tage nach Transfektion für die Herstellung von Zelllysaten verwendet. Die übrigen neun Ansätze wurden 24 h nach Transfektion einer Geneticinselektion auf L1-Retrotranspositionereignisse unterworfen. Nach 11 Tagen der Selektion wurden die geneticinresistenten Kolonien von jeweils drei Ansätzen fixiert und gezählt. Die Kolonien, die aus den übrigen jeweils sechs Ansätzen hervorgingen, wurden vereinigt und für weitere sieben Tage in Selektionsmedium inkubiert. Nachdem die Zelldichte in den Platten Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen geerntet und ihre genomische DNA wurde isoliert. (B) L1-Retrotranspositionsreporterassay in Anwesenheit von überexprimiertem A3C. Nur eine repräsentative Platte von jeweils drei fixierten und angefärbten Ansätzen ist gezeigt. (C) Die Immunoblotanalyse von 20 µg Zellextrakt mit dem α-HA-„tag“-Antikörper zeigte die Expression von A3C (MW ~ 22 kDa). Das Balkendiagramm dokumentiert die Hemmung der L1-Aktivität durch A3C um 53 %. Als Ladekontrolle diente die β-Aktinexpression (MW ~42 kDa).

Die A3C-Expression, welche zwei Tage nach Transfektion nachgewiesen werden konnte, führte zu einer Hemmung der L1-Aktivität um 53 % (Abb. 29B und C). Im nächsten Schritt sollte die Anzahl der 3'-Enden von *neo*-markierten *de novo* L1-Insertionen in HeLa-Zellen mit überexprimiertem A3C mit der in Zellen ohne überexprimiertem A3C verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die aus den Mischpopulationen isolierten genomische DNAs mit der Restriktionsendonuklease *MspI* inkubiert, da nur dieses Enzym eine Restriktionsstelle innerhalb der Neomycin-Phosphotransferase-Kassette besitzt und seine Erkennungssequenz nur vier Nukleotide umfasst (Abb. 30A). Dadurch wurde gewährleistet,

dass die entstehenden genomischen Restriktionsfragmente kurz genug waren, um ihre Zirkularisierung zu erlauben (Abb. 30A).

Von den so erzeugten Fragmenten waren diejenigen von Bedeutung, deren 5'-Ende durch die definierte *MspI*-Restriktionsstelle in der *neo*-Kassette gebildet wurde (Abb. 30). Das 3'-Ende eines solchen Fragments ist durch eine *MspI*-Schnittstelle definiert, die irgendwo in der 3'-flankierenden genomischen DNA lokalisiert ist. Es folgte die Zirkularisierung dieser Fragmente mittels T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) und die anschließende Amplifikation der Übergänge vom 3'-Ende der *neo*-Kassette in die 3'-flankierenden genomischen Regionen mit Hilfe der „Primer“ GS627 und GS628. Beide „Primer“ binden in entgegengesetzter Orientierung an die SV40-Promotorsequenz (Abb. 10 und 30A; Kap. 2.2.6). Wegen der zufälligen Verteilung der *MspI*-Restriktionsschnittstellen in der genomischen DNA beinhaltete jedes zirkularisierte Fragment ein individuelles PCR-Produkt mit individueller Länge. Nach der Auftrennung dieser verschieden langen PCR-Produkte im Agarosegel ist eine Quantifizierung der 3'-Enden der *de novo* L1-Integrationen möglich. Bedingt durch das 3'-Ende der L1-Reporterkassette in pJM101/L1_{RP} sowie durch die Lokalisierung der *MspI*-Restriktionsstelle in der Neomycin-Phosphotransferase-Kassette umfaßte jedes dieser PCR-Produkte ≥ 529 bp (Abb. 10 bzw. 30A).

Im Anschluß an die Zirkularisierung der genomischen DNA, aber noch bevor die L1-spezifischen PCR-Reaktionen angesetzt wurden, wurde mit Hilfe einer PCR-Analyse zunächst auf die Nachweisbarkeit des *gapdh*-Gens getestet, um zu prüfen, ob für den Nachweis von „*single-copy*“-Genen noch ausreichende Mengen an DNA vorhanden war (Abb. 30C, D). Bei Anwesenheit ausreichender Mengen an genomischer DNA wird ein 138 bp großes Fragment aus Exon 8 des humanen GAPDH-Gens amplifiziert (Abb. 30C, D).

Abbildung 30D zeigt, dass sich in jedem der *MspI*-restringierten genomischen Ansätze aus Mischpopulationen ausreichende und in etwa gleiche Mengen an DNA für die L1-spezifische PCR-Analyse befanden. Die Mengen amplifizierter DNA-Fragmente aus den verschiedenen Mischpopulationen sind vergleichbar.

Um die Spezifität der L1-Reporter-spezifischen „Primer“ GS627 und GS628 unter stringenten PCR-Bedingungen zu prüfen, wurde als Negativkontrolle eine PCR an genomischer HeLa-DNA durchgeführt, die aus nicht transfizierten Zellen stammte (Abb. 30B, Spur 2). Da hier im Gegensatz zu genomischer DNA aus pJM101/L1_{RP}-transfizierten Zellen (Abb. 30B, Spuren 3 und 4) keinerlei PCR-Produkte generiert wurden, zeigt dieses Ergebnis die Spezifität der PCR-Bedingungen für den gezielten Nachweis der 3'-Enden der retrotransponierten L1-Reporterelemente. Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode der inversen PCR (Abb. 30A) wurden im Falle der A3C-Überexpression nur ca. acht und im Falle der Abwesenheit von überexprimiertem A3C mindestens 13 L1-3'-Enden amplifiziert (Abb. 30D, Spuren 3 und 4). Somit wurden trotz der annähernd gleichen Anzahl an vereinigten genetischen

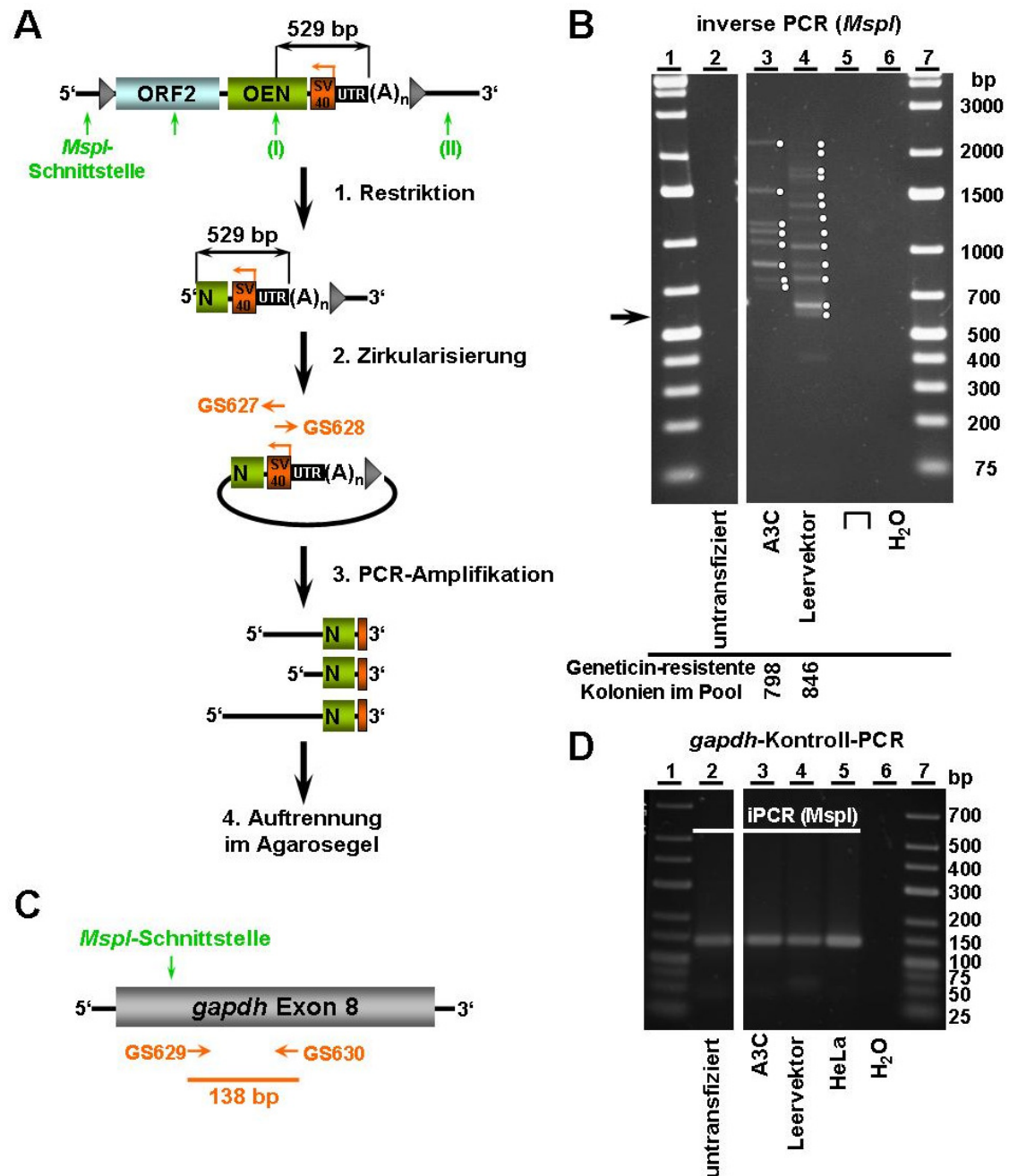


Abbildung 30: A3C-Überexpression führte zu einer Verringerung der Anzahl an detektierbaren 3'-Enden von *de novo* L1-Insertionen. (A) Genomische DNA wurde mit dem Enzym *MspI* restringiert und die resultierenden Fragmente wurden mittels T4-DNA-Ligase zirkularisiert. Mit Hilfe der Primer GS627 und GS628, die spezifisch an den SV40-Promotor der L1-Reporterelemente binden, wurden diejenigen Fragmente amplifiziert, die 3'-Enden markierter *de novo* L1-Insertionen trugen. Jedes dieser Fragmente besaß wegen der zufälligen Lokalisation der jeweiligen 3'-flankierenden genomischen *MspI*-Schnittstelle eine individuelle Länge. Nach Auftrennung dieser Fragmente im Agarosegel erfolgte die Quantifizierung. Aufgrund der Lokalisation der in dem Neomycin-Phosphotransferasegen lokalisierten *MspI*-Restriktionsstelle relativ zum 3'-Ende der L1-Reporterkassette beträgt die Minimallänge des PCR-Produktes 529 bp. (B) In der inversen PCR mit den „Primern“ GS627 und GS628 war in der Spur mit untransfizierter HeLa-DNA (Spur 1), die während des ganzen Prozesses mitgeführt wurde, keine Bande detektierbar. Der Kontrollansatz ohne DNA (H₂O; Spur 6) zeigte keine Banden. (C) Lokalisierung der Bindestellen der „Primer“ GS629 und GS630 sowie der Restriktionsstelle des Enzyms *MspI* innerhalb von Exon 8 des menschlichen *gapdh*-Gens. (D) Die *gapdh*-Kontroll-PCR ergab annähernd gleich starke Banden mit einer Größe von 138 bp in allen Spuren. Folglich waren in jedem Ansatz in etwa gleiche Mengen an DNA enthalten. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 200 ng unrestringierter genomischer DNA aus HeLa-Zellen (HeLa; Spur 5). Die Spur mit dem Kontrollansatz ohne DNA (H₂O, Spur 6) zeigte keine Bande.

Kolonien, die jeweils mindestens ein Retrotranspositionseignis repräsentieren, aus dem Ansatz, der A3C überexprimiert hatte, weniger L1-3'-Enden isoliert als aus dem Ansatz, der A3C nicht überexprimierte (Abb. 30B).

Auch wenn es sich hier in beiden Fällen jeweils um eine sehr niedrige Anzahl von amplifizierten *de novo* L1-Insertionen handelt (berücksichtigt man, dass in beiden Fällen von ca. 800 *de novo* Insetionen ausgegangen wurde), so ist das Ergebnis doch konsistent mit den Daten aus Kapitel 3.3, die zeigen, dass A3C die L1-Retrotransposition nicht gemäß der Arbeitshypothese durch Deaminierung von Cytosinen in der L1-cDNA hemmt. Die erhöhte Anzahl detektierbarer L1-3'-Enden in der Mischpopulation ohne überexprimiertes A3C liesse sich beispielsweise dadurch erklären, dass in Abwesenheit von A3C pro Zelle mehr als nur ein Retrotranspositionseignis stattfand.

3.5 Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion zwischen APOBEC3-Proteinen und dem L1-Ribonukleoproteinkomplex

3.5.1 APOBEC3C und L1-ORF1p-Komplexe kolokalisieren in der gleichen Fraktion eines Saccharosegradienten

Da gezeigt werden konnte, dass die durch A3C vermittelte Inhibition der L1-Retrotransposition nicht über Deaminierung von Cytosinen erreicht wird (Kap. 3.3.2), stellte sich die Frage, ob diese Inhibition über eine direkte Interaktion mit L1-RNA, L1-cDNA oder L1-Proteinen vermittelt wird. In einem solchen Fall wäre eine Interaktion zwischen A3C und L1-RNPs wahrscheinlich. Diese Möglichkeit wird unterstrichen durch die Beobachtung, dass A3G, welches die HIV Δ *vif*-Replikation inhibiert, in HIV Δ *vif*-Partikel verpackt wird (Mariani *et al.*, 2003).

Um die Frage nach einer möglichen Interaktion zwischen A3C und L1-RNPs zu beantworten, wurde zuerst das L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} (3 μ g) in HeLa-Zellen transfiziert und für acht Tage auf die Anwesenheit dieses Plasmids durch Hygromycin B-Zugabe selektioniert (Abb. 3.13A). Acht Tage nach dieser Transfektion schloß sich eine zweite Transfektion mit 3 μ g A3C-Expressionsplasmid an. Drei Tage später wurden die Zellen geerntet und die Zelllysate hergestellt, die dann über einen 10 – 50 %-igen Saccharosegradienten aufgetrennt wurden (Kap. 2.4.7). Der Gradient wurde in 11 Fraktionen unterteilt, die dann in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen überführt und mit ca. 3 ml DEPC-H₂O gemischt wurden. Nach der Pelletierung der Proteinfaktionen bei 176.000 g für 2 h bei 4 °C wurden die Pellets jeweils in 20 μ l DEPC-H₂O (1 x COMPLETE Proteaseinhibitormix; Roche Diagnostics, Mannheim) gelöst. Anschließend wurden die gesamten 20 μ l gelöstes Pellet je Fraktion mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblotanalysen (Abb. 31) mit α -L1-ORF1p-

und α -HA-„tag“-Antikörpern auf die Anwesenheit von L1-RNPs bzw. A3C untersucht (Diplomarbeit Alexandra Klein: „Lokalisation von APOBEC3-Proteinen und deren Interaktion mit dem humanen LINE-1-RNP-Komplex“).

In einer Immunoblotanalyse aller pelletierten Fraktionen mit dem α -L1-ORF1p-Antikörper konnte ORF1p ausschließlich im Pellet von Fraktion 9 (20 % Saccharose) identifiziert werden (Abb. 31B). Im Gegensatz dazu konnte A3C in der Immunoblotanalyse mit einem α -HA-„tag“-Antikörper im Pellet keiner Fraktion nachgewiesen werden, was dafür sprechen würde, dass A3C und L1-ORF1p keine Aggregate bilden. Allerdings muß hier berücksichtigt werden, dass die Fraktionen vor ihrer Zentrifugation mit dem Ziel der Pelletierung von Proteinkomplexen für mehrere Tage bei -80 °C gelagert wurden, wodurch die Zerstörung von Proteinkomplexen durch Einfrier- und Auftauvorgänge ermöglicht wurde. Wenn tatsächlich putative A3C/L1-ORF1p-Komplexe auf diese Weise zerstört wurden, sollten sich in den Überständen ein- und derselben Fraktion sowohl A3C als auch L1-ORF1p befinden. Um dies zu prüfen, wurde eine TCA-Fällung sämtlicher Proteine in den Fraktionsüberständen durchgeführt (Kap. 2.4.7). Die präzipitierten Proteine wurden anschließend in 20 μ l DEPC-H₂O gelöst. Sämtliche 20 μ l-Ansätze der präzipitierten Proteine aus den Fraktionsüberständen wurden dann mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblotanalysen auf die Anwesenheit von L1-ORF1p und A3C untersucht.

Die Immunoblotanalysen der präzipitierten Proteine aus den Fraktionen zeigten, dass L1-ORF1p in den Fraktionen 8 – 11 (10 – 23 % Saccharose) vorliegt, während A3C ausschließlich in Fraktion 9 identifiziert wurde (Abb. 31C). Dabei trat die größte Menge an L1-ORF1p zusammen mit A3C in genau der Fraktion auf (20 % Saccharose), in der auch L1-ORF1p-Komplexe durch Abzentrifugieren und anschließende Immunoblotanalyse (Abb. 31B) identifiziert werden konnten.

Sollte die Interaktion zwischen RNA und A3C essentiell für eine A3C-vermittelte Hemmung der L1-Retrotransposition sein, so käme die L1-RNA als Interaktionspartner in Frage. Wenn eine derartige Interaktion stattfindet, wäre es möglich, dass A3C so in L1-RNPs inkorporiert würde. Die Lokalisierung von A3C und L1-ORF1p in ein und derselben Fraktion eines Saccharosegradienten unterstützt dabei die Hypothese der A3C-Inkorporation in L1-RNPs und ist damit konsistent mit den Ergebnissen, dass A3C-RNA-Bindetaschen- und Dimerisierungsmutanten die L1-Retrotransposition nicht mehr hemmen können (Kap. 3.3.3 und 3.3.4). Die Beobachtung, dass A3C nur in einer der sechs Fraktionen identifiziert wurde, in denen L1-ORF1p nachgewiesen werden konnte (Abb. 31C), spricht dafür, dass A3C mit einer bestimmten Komponente des L1-RNPs interagiert, bei der es sich nicht um L1-ORF1p selbst handelt.

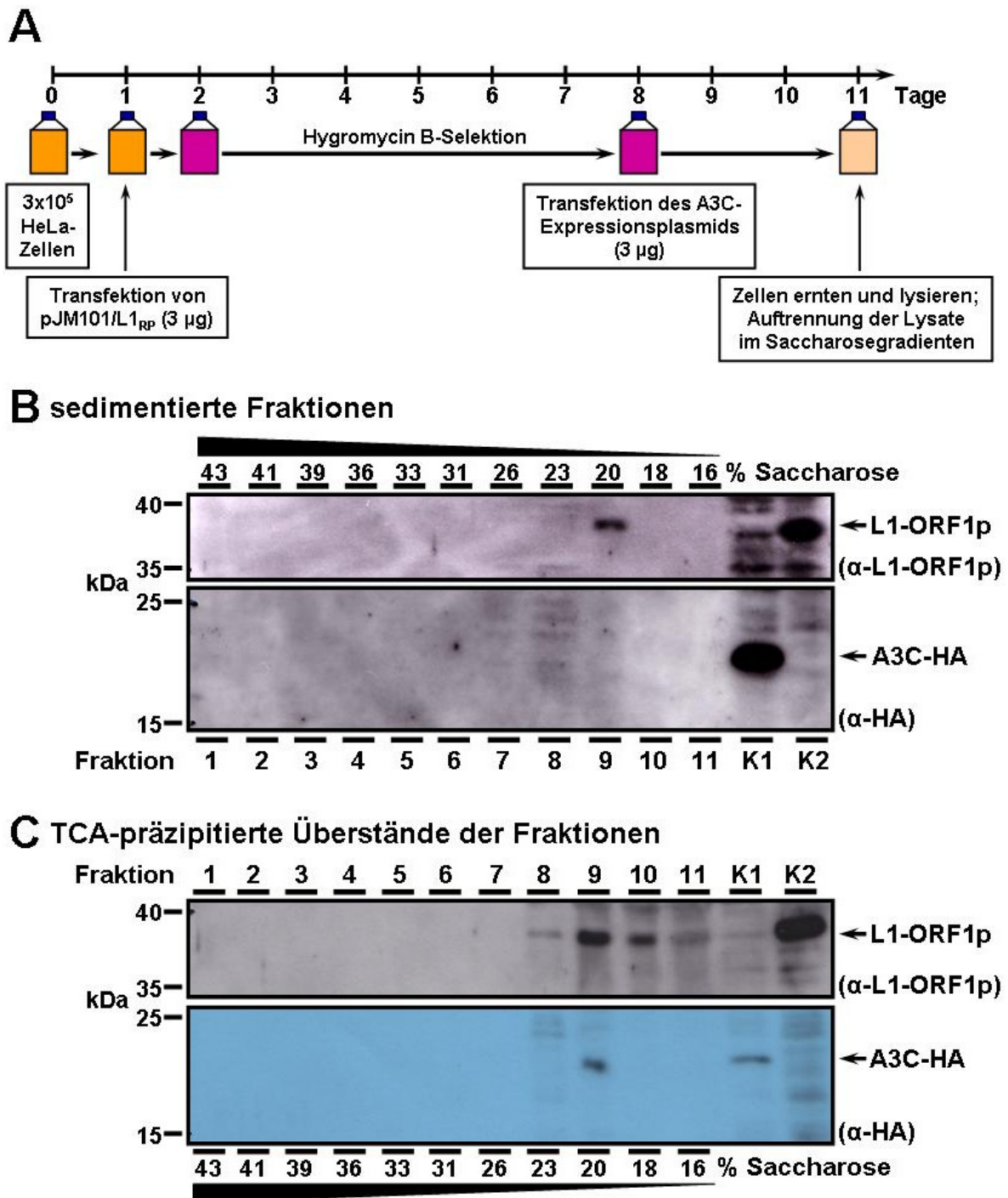


Abbildung 31: Identifizierung von L1-ORF1p und A3C in definierten Fraktionen eines Saccharosegradienten. (A) Schema zur Durchführung des experimentellen Ansatzes. L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} und A3C-Expressionsplasmid wurden nacheinander in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 11 Tagen wurden die transfizierten Zellen geerntet, und das Zelllysate wurde über einen Saccharosegradienten mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt. (B) Immunoblotanalysen der durch Zentrifugation sedimentierten Proteinkomplexe mit Antikörpern gegen L1-ORF1p (α-L1-ORF1p) und A3C (α-HA). L1-ORF1p (MW ~ 40 kDa) konnte in Fraktion 9 nachgewiesen werden, während A3C (MW ~ 22 kDa) nicht detektierbar war. Die Saccharosekonzentration wurde für jede Fraktion bestimmt. (C) Immunoblotanalyse der durch TCA präzipitierten Überstände der Fraktionen. L1-ORF1p und A3C traten ausschließlich in Fraktion 9 gemeinsam auf, während L1-ORF1p in den Fraktionen 8 – 11 nachweisbar war. Als HA-„tag“-Kontrolle diente ein Lysat von HeLa-Zellen aus einem früheren Versuch, die mit dem A3C-Expressionsplasmid sowie dem L1-Reporterkonstrukt pJM101/L1_{RP} kotransfiziert worden waren (K1). Als Positivkontrolle zum Nachweis von L1-ORF1p (K2) dienten 20 µg Lysat der 2102EP-Zelllinie, die L1-ORF1p in großen Mengen endogen exprimiert. Diese Arbeiten wurden von Alexandra Klein im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

3.5.2 Nachweis der Kolokalisation von APOBEC3C und L1-ORF1p im Zytoplasma von HeLa- und 143B-Zellen mittels Immunofluoreszenzanalysen

Die Kolokalisation von A3C und L1-ORF1p in der gleichen Fraktion eines Saccharosegradienten (Kap. 3.5.1) ist konsistent mit der Hypothese, dass A3C in die L1-RNPs inkorporiert wird. Weiterhin wurde von Chiu *et al.* (2006) gezeigt, dass die *Alu*-RNA mit A3G in sogenannten „*Processing bodies*“ (P-bodies) kolokalisiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese entwickelt, dass A3G die *Alu*-RNA in diese „*P-bodies*“ sequestriert und damit von den L1-kodierten Proteinen fernhält, wodurch die *Alu*-Retrotransposition verhindert wird. Neben A3G wurden auch A3B und A3F in den „*P-bodies*“ nachgewiesen (Chiu *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2006; Wichroski *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007).

Um zu prüfen, ob A3C bei der möglichen Sequestrierung von L1-RNPs in spezifische zelluläre Kompartimente beteiligt ist, wie sie beispielsweise die „*P-bodies*“ darstellen, wurde die subzelluläre Lokalisation von A3C und L1-ORF1p mittels Immunofluoreszenzstudien (Kap. 2.4.6) untersucht. Zu diesem Zweck wurden 2×10^5 HeLa-Zellen je Vertiefung einer 6-Lochplatte auf einem Deckgläschen ausgesät und 24 Stunden später mit dem L1-Retrotranspositionsreporterplasmid pDK101 (Abb. 11) und je einem Expressionsplasmid, welches für A3C-WT oder für die Mutanten C97S/C1001S, F55A, W74A bzw. R122A (Kap. 2.1.2) kodiert, kotransfiziert. Die Deaminasedomänenmutante C97S/C100S wurde gewählt, da sie die L1-Retrotransposition vergleichbar dem A3C-WT hemmt (Kapitel 3.3.2). Weder die beiden Dimerisierungsmutanten F55A und W74A (Kap. 3.3.4) noch die RNA-Bindetaschemutante R122A (Kap. 3.3.3) besitzen einen hemmenden Effekt auf die L1-Retrotranspositionsrate. Um zu prüfen, ob die subzelluläre Lokalisation von L1-ORF1p durch A3C-WT beeinflusst wird, wurde ein Kontrollansatz mit dem L1-Retrotranspositionsreporterplasmid pDK101 und dem leeren A3C-Expressionvektor pcDNA3.1/Zeo(+) (Kap. 2.1.2) kotransfiziert. Ein weiterer Kontrollansatz bestand aus pCEP4, dem leeren episomalen Expressionsvektor für die L1.3-Expressionskassette in pDK101, und dem A3C-WT-Expressionsplasmid. Ca. 72 Stunden nach der Kotransfektion wurden die Zellen auf dem Deckgläschen fixiert. Anschließend folgte die Immunoreaktion mit dem α -HA-„tag“-Antikörper zum Nachweis der HA-markierten A3C-WT- bzw. Mutantenproteine sowie parallel mit dem α -T7-„tag“-Antikörper zum Nachweis des T7-markierten L1-ORF1p. Zur besseren Unterscheidung vom Zytoplasma wurden die Zellkerne abschließend mittels DAPI angefärbt.

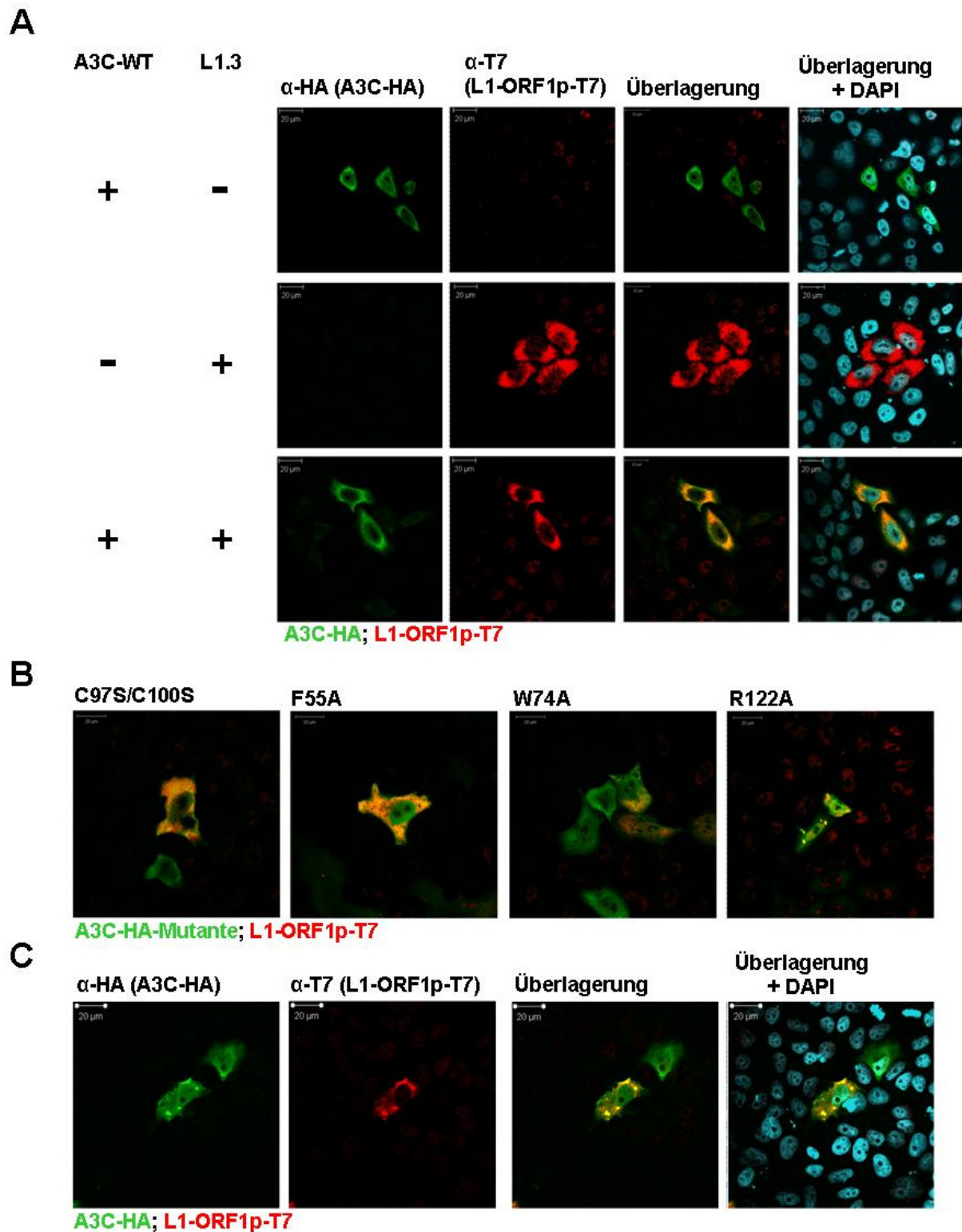


Abbildung 32: Bestimmung der subzellulären Lokalisation von A3C und L1-ORF1p in HeLa- und 143B-Zellen. (A) Immunfluoreszenzanalyse zum Nachweis der Lokalisation von HA-markiertem A3C-WT (grün) und T7-markiertem L1-ORF1p (rot) in HeLa-Zellen. Die beobachtete Verteilung (gelb) beider Proteine im Zytoplasma ist konsistent mit einer möglichen Interaktion von A3C-WT mit L1-RNPs. Die An- bzw. Abwesenheit von überexprimiertem A3C-WT-Proteinen hatte keinen Einfluß auf die zytoplasmatische Lokalisation von L1-ORF1p. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. **(B)** Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis der Lokalisation von HA-markierten A3C-Mutantenproteinen (grün) und T7-markiertem L1-ORF1p (rot) in HeLa-Zellen. Während A3C-WT und die L1-inhibierende Deaminasedomänenmutante C97S/C100S gemeinsam mit L1-ORF1p im Zytoplasma vorlagen, waren die Dimerisierungsmutanten F55A und W74A sowie die RNA-Bindetaschenmutante R122A, die keinerlei L1-inhibierenden Effekt mehr besitzen, auch im Zellkern

nachweisbar. Keines der vier A3C-Mutantenproteine beeinflusste die zytoplasmatische Lokalisation von L1-ORF1p. (C) Immunofluoreszenzanalyse zum Nachweis der Lokalisation von HA-markiertem A3C-WT (grün) und T7-markiertem L1-ORF1p in humanen 143B-Zellen. Während A3C sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorlag, fand man L1-ORF1p ausschließlich im Zytoplasma. Eine intensive Kolokalisation beider Proteine fand man in kleinen zytoplasmatischen Regionen.

Abbildung 32A zeigt repräsentative Immunofluoreszenzaufnahmen zur Lokalisation von A3C-WT (α -HA, grün) und L1-ORF1p (α -T7, rot). Im Kontrollansatz, in dem nur A3C-WT überexprimiert wurde (obere Reihe), ist A3C-WT vor allem im gesamten Zytoplasma lokalisiert. Der Kontrollansatz, in dem nur die L1-kodierten Genprodukte überexprimiert wurden (mittlere Reihe), zeigte, dass L1-ORF1p nur im Zytoplasma der HeLa-Zellen nachweisbar war. Dieses Ergebnis stimmt mit der zytoplasmatischen Lokalisation von L1-ORF1p überein, die Goodier *et al.* (2004) in 143B-Zellen zeigten. Die schwache Rotfärbung im Zellkern ist vermutlich auf unspezifischen Reaktionen des α -T7-„tag“-Antikörpers zurückzuführen. Im Ansatz, in dem sowohl A3C-WT als auch L1-kodierte Genprodukte überexprimiert wurden (untere Reihe), zeigte die Überlagerung der beiden Detektionskanäle, dass A3C-WT und L1-ORF1p im Zytoplasma von HeLa-Zellen gleichmäßig verteilt waren (gelb). Dabei wurde für L1-ORF1p keine Veränderung in der subzellulären Lokalisation in An- bzw. Abwesenheit von überexprimiertem A3C-WT beobachtet. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Sequestrierung von L1-ORF1p bzw. L1-RNPs durch A3C.

Die Überlagerung der beiden Kanäle, die HA-markierte A3C-Mutantenproteine bzw. T7-markiertes L1-ORF1p detektieren (Abb. 32B), zeigte sowohl für die L1-inhibierende Mutante C97S/C100S als auch für die Mutanten F55A, W74A und R122A, die alle drei die L1-Retrotransposition nicht hemmen können (Kap. 3.3.3 und 3.3.4), eine gleichmäßige Verteilung mit L1-ORF1p ausschließlich im Zytoplasma. Die L1-hemmende Mutante C97S/C100S war wie auch das A3C-WT-Protein hauptsächlich im Zytoplasma detektierbar. Die drei anderen Mutanten ohne L1-hemmenden Effekt (F55A, W74A und R122A) waren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern verteilt. Bei der R122A-Mutante fiel auf, dass A3C-WT und L1-ORF1p zusätzlich auch in speziellen zytoplasmatischen Regionen angereichert waren. Der L1-inhibierende Effekt von A3C beruht folglich wohl nicht auf der Kolokalisation von A3C und L1-ORF1p im Zytoplasma.

Da eine Anreicherung von L1-ORF1p in zytoplasmatischen Regionen bereits für 143B-Zellen dokumentiert wurde (Goodier *et al.*, 2004), wurden die Kolokalisationsstudien für A3C-WT und L1-ORF1p in 143B-Zellen wiederholt (Kap. 2.4.6). Dafür wurden 3×10^5 Zellen je Vertiefung einer 6-Lochplatte auf einem Deckgläschen ausgesät und 24 Stunden später mit dem L1-Retrotranspositionsreporterplasmid pDK101 und dem A3C-WT-Expressionsplasmid kotransfiziert. Ca. 72 Stunden nach der Kotransfektion folgte die Fixierung der Zellen. Die Immunoreaktion mit dem α -HA-„tag“-Antikörper (A3C-WT) und dem α -T7-„tag“-Antikörper (L1-ORF1p) wurde parallel durchgeführt. Eine Färbung mit DAPI stellte sicher, dass der

Zellkern vom Zytoplasma unterschieden werden konnte. A3C-WT war sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 32C), wobei im Zytoplasma auch eine Anreicherung in speziellen Kompartimenten sichtbar war. Die Überlagerung beider Detektionskanäle für A3C-WT und L1-ORF1p zeigte, dass L1-ORF1p auch in 143B-Zellen im Zytoplasma, speziell dort aber auch in lokalen Anreicherungen, mit A3C-WT kolokalisierte.

Die beobachtete Kolokalisation von A3C und L1-ORF1p im Zytoplasma von HeLa- und 143B-Zellen ist konsistent mit der Hypothese, dass A3C in L1-RNPs inkorporiert wird. Da die Kolokalisation aber auch für A3C-Mutantenproteine ohne L1-inhibierenden Effekt beobachtet wurde, scheint die L1-hemmende Aktivität von A3C nicht von dieser Kolokalisation abhängig zu sein. Das und die fehlende Veränderung der subzellulären Lokalisation von L1-ORF1p in An- bzw. Abwesenheit von überexprimiertem A3C sprechen gegen eine Sequestrierung der L1-RNPs durch A3C als den eigentlichen L1-hemmenden Mechanismus. Die lokale Anreicherung von A3C und L1-ORF1p im Zytoplasma von 143B-Zellen (Abb. 32C, gelb) könnte so erklärt werden, dass sowohl A3C als auch L1-ORF1p an L1-RNA binden und dieser RNP-Komplex über die A3C-Interaktion in zytoplasmatische „*P-bodies*“ transportiert wird.

3.5.3 Prüfung der Möglichkeit einer Interaktion zwischen APOBEC3A bzw. APOBEC3C und L1-ORF1p

Die Identifizierung von A3C und L1-ORF1p in derselben Fraktion eines Saccharosegradienten (Abb. 31, S. 76; 20 % Saccharose), in der auch sedimentierte L1-ORF1p-Komplexe gefunden wurden, spricht für die Möglichkeit, dass A3C zusammen mit L1-RNPs als Komplex vorliegt.

Um die Fähigkeit von A3C und L1-ORF1p zur Interaktion zu prüfen, wurden HA-markiertes A3C-WT und FLAG-markiertes L1-ORF1p in HeLa-Zellen überexprimiert und anschließend Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zunächst 3×10^5 HeLa-Zellen je Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und zwei Tage später mit 5×10^5 pfu / ml (MOI = 1) MVA/T7RP (Kap. 2.3.5) infiziert. Eine Stunde später schloss sich eine Kotransfektion mit dem L1-ORF1p-Expressionsvektor pMini-FLAG-ORF1 (Abb. 12) sowie dem A3A- oder A3C-Expressionsplasmid (Abb. 13) an. Um auf solche Kopräzipitationsbedingungen zu kontrollieren, die eine stabile Interaktion mit A3C erlaubten, wurden die A3C-Expressionsplasmide pcA3C-HA.Zeo und pcDNA3.1-APOBEC3C-V5-6xHis (Abb. 13, 14) kotransfiziert, die jeweils die Expression von HA-markierten bzw. V5-markierten A3C-Proteinen gewährleisteten. Da gezeigt wurde, dass A3C als Dimer agiert (Stauch *et al.*, 2009), wurden diejenigen Immunopräzipitationsbedingungen gewählt, die eine Interaktion zwischen A3C-V5 und A3C-HA ermöglichten. Ca. 16 Stunden nach der Infektion

folgten die Lyse der Zellen und die Immunopräzipitation der APOBEC3-Proteine mittels der HA-Matrix (Roche Diagnostics, Mannheim; Kap. 2.4.5). Als Positivkontrolle für erfolgreiche Detektion von HA- bzw. FLAG-„tag“ wurde Zellextrakt aus Zellen auf das Proteingel geladen, die in einem früheren Experiment erfolgreich mit dem A3A-HA-Expressionsplasmid bzw. mit pMini-FLAG-ORF1 (Abb. 12) transfiziert und mit MVA/T7RP infiziert worden waren. Als Kontrollexperiment wurde Zellextrakt von HeLa-Zellen, die weder transfiziert noch infiziert worden waren, ebenfalls der Immunopräzipitationsprozedur unterworfen, und eventuell entstandene Präzipitate wurden auch in der Immunoblotanalyse untersucht.

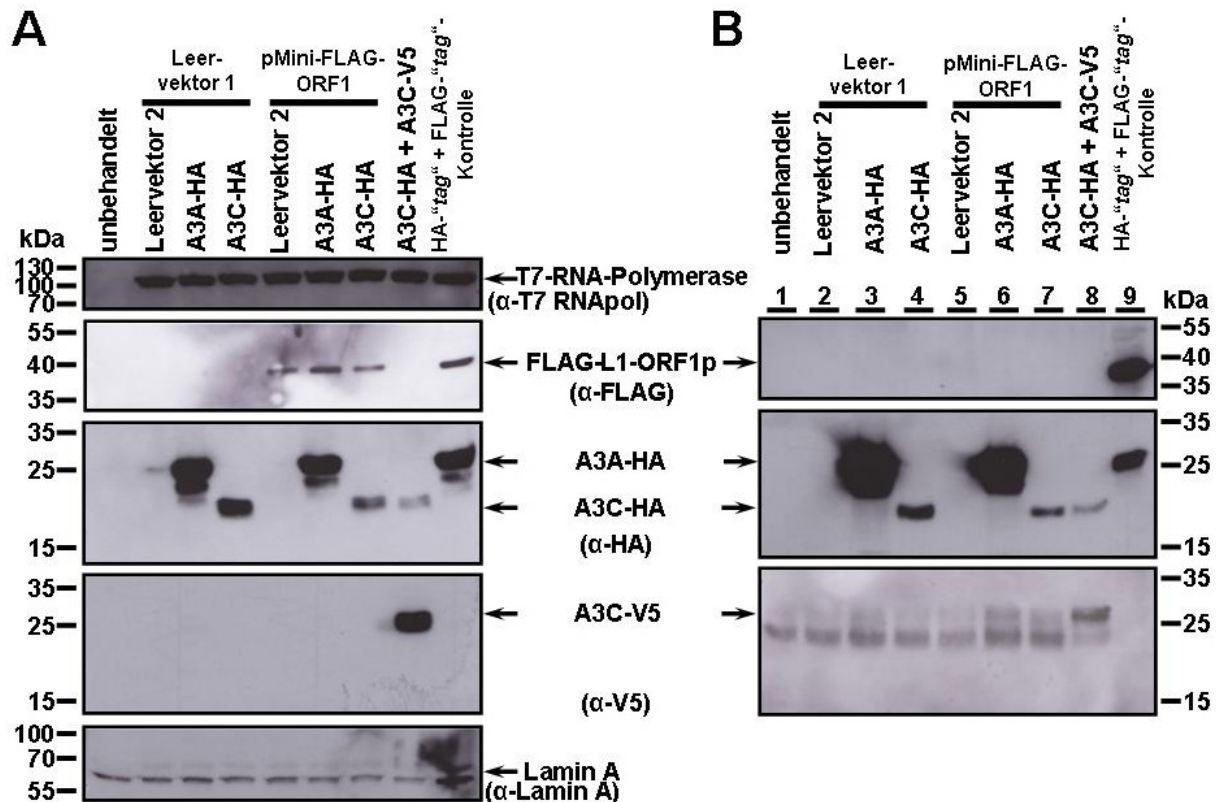


Abbildung 33: Immunoblotanalysen der Immunopräzipitate sprechen gegen eine Interaktion zwischen L1-ORF1p und A3A bzw. A3C. (A) Immunoblotanalyse der Zellextrakte von HeLa-Zellen, in die A3C- oder A3A-Expressionsplasmide entweder mit dem FLAG-L1-ORF1p-Expressionskonstrukt pMini-FLAG-ORF1 oder mit seinem entsprechenden Leervektor (Leervektor 1) kotransfiziert wurden (siehe Text). Die Expression der Proteine FLAG-L1-ORF1p (MW ~ 40 kDa), A3A-HA (MW ~ 25 kDa), A3C-HA (MW ~ 22 kDa), A3C-V5 (MW ~ 27 kDa), T7-RNA-Polymerase (MW ~ 100 kDa) und Lamin A (MW ~ 66 kDa) wurde mit den Antikörpern α-FLAG, α-HA, α-V5, α-T7RNApol und α-Lamin A nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente die Immunoblotanalyse mit dem α-Lamin A-Antikörper. Leervektor 1, pMini-SC; Leervektor 2, pcDNA3.1/Zeo(+). (B) Immunoblotanalyse der über eine HA-Matrix präzipitierten bzw. kopräzipitierten Proteine. Mit Hilfe der HA-Matrix wurden A3A-HA und A3C-HA bzw. Proteinkomplexe, die mit A3A-HA bzw. A3C-HA assoziiert sind, präzipitiert. Die Präzipitate wurden im 12 %-PAA-Gel aufgetrennt und durch Immunoblotanalysen mit α-FLAG-, α-HA- bzw. α-V5-Antikörpern auf Anwesenheit von FLAG-L1-ORF1p, A3A-HA bzw. A3C-HA und A3C-V5 untersucht. Nachweis von A3C-V5-spezifischem Signal ausschließlich in Spur 8 (27 kDa). Spur 9 (Kontrolle): 20 µg Zellextrakt aus HeLa-Zellen, in denen A3A-HA und FLAG-L1-ORF1p in früheren Experimenten erfolgreich exprimiert worden waren. Diese Kontrolle diente zum Nachweis der Spezifität der α-HA- und α-FLAG-Antikörper.

Mittels Immunoblotanalyse wurde zunächst die Expression von T7-RNA-Polymerase, L1-ORF1p, A3A-HA, A3C-HA sowie von A3C-V5 in den Zelllysaten ermittelt, bevor diese für

Immunopräzipitationsexperimente eingesetzt wurden (Abb. 33A). Über den Nachweis des konstitutionell exprimierten Proteins Lamin A mittels Immunoblotanalyse wurde gezeigt, dass jede Spur des Proteingels mit vergleichbaren Mengen an Zelllysate beladen wurde. Die Immunoblotanalyse mit dem α -T7-RNA-Polymeraseantikörper zeigte, dass die für die Expression von L1-ORF1p essentielle T7-RNA-Polymerase, die durch das MVA/T7RP-Expressionssystem kodiert wird, in jedem Zelllysate mit Ausnahme der unbehandelten Zellen effizient exprimiert wurde. Die Expression von L1-ORF1p (40 kDa) konnte in jedem Zelllysate nachgewiesen werden, dessen Zellen mit pMini-FLAG-ORF1 transfiziert worden waren. Mit Ausnahme der Koexpression von A3C-HA mit L1-ORF1p bzw. mit A3C-V5, in denen vergleichsweise geringe Mengen an A3C-HA exprimiert wurden, lieferten die übrigen Kotransfektionen mit A3A- und A3C-Expressionsplasmiden hohe Expressionsraten von A3A bzw. A3C (Abb. 33A). Auch die A3C-V5-Expression war sehr stark, so dass in jedem Fall ausreichende Mengen an den beteiligten Proteinen vorlagen, um mögliche Interaktionen in Immunopräzipitationsexperimenten nachzuweisen.

Um die entsprechenden Zelllysate auf eine Interaktion zwischen L1-ORF1p und A3A bzw. A3C hin zu untersuchen, wurden sämtliche Zelllysate mit der HA-Matrix immunopräzipitiert. Die daraus resultierenden Präzipitate wurden in 30 μ l IP-Probenpuffer resuspendiert. 15 μ l aus jedem Ansatz wurden in einem 12 %-igen PAA-Gel aufgetrennt und Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen FLAG-L1-ORF1p (α -FLAG), A3A-HA bzw. A3C-HA (α -HA) sowie gegen A3C-V5 (α -V5) unterworfen (Abb. 33B). Da der α -HA-Antikörper in den Spuren 3 und 6 bzw. 4 und 7 jeweils das 25 kDa A3A-HA-Protein bzw. das 22 kDa A3C-HA-Protein detektierte, wurde gezeigt, dass die Immunopräzipitation mit der HA-Matrix erfolgreich war. Da in Spur 8 sowohl A3C-HA als auch A3C-V5 nachweisbar waren, zeigte dies, dass mit dem α -HA-„tag“-Antikörper A3C-HA/A3C-V5-Dimere kopräzipitiert werden konnten und somit die Immunopräzipitationsbedingungen Protein-Protein-Interaktionen und Kopräzipitationen erlaubten. Da allerdings die Immunoblotanalyse der Präzipitate ausschließlich FLAG-L1-ORF1p in der Positivkontrolle nachwies (Abb. 33B, Spur 9, α -FLAG), zeigte dies, dass FLAG-L1-ORF1p weder mit A3A noch mit A3C kopräzipitiert werden konnte. Dies wiederum sprach dafür, dass weder A3A noch A3C direkt mit L1-ORF1p interagiert.

Um zu überprüfen, ob für eine mögliche Interaktion zwischen L1-ORF1p und A3A bzw. A3C die Anwesenheit der übrigen L1-kodierten Genprodukte wie L1-mRNA und L1-ORF2p erforderlich ist, wurden A3A-HA bzw. A3C-HA im folgenden Experiment zusammen mit einem vollständigen, retrotranspositionscompetenten L1-Element exprimiert. Zu diesem Zweck wurden $1,5 \times 10^6$ HeLa-Zellen mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} bzw. mit dem korrespondierenden Leervektor pCEP4 transfiziert. Beide Kulturen wurden dann durch Zugabe von Hygromycin B auf Anwesenheit der episomalen Plasmide selektioniert. Danach

wurden 3×10^5 dieser vorselektionierten HeLa-Zellen je Vertiefung einer 6-Lochplatte erneut ausgesät und 24 h später mit je 1 µg des A3A- oder A3C-Expressionsplasmids transfiziert. Um sicherzustellen, dass die Immunopräzipitationsexperimente unter solchen Versuchsbedingungen stattfinden, die eine stabile Proteininteraktion mit überexprimierten A3C-Proteinen erlauben, wurden die Bedingungen so gewählt, dass eine stabile Interaktion von A3C-HA und A3C-V5, die bereits von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden konnte, gewährleistet waren. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit jeweils 0,5 µg der Expressionsplasmide pcA3C-HA.Zeo und pcDNA3.1-APOBEC3C-V5-6xHis kotransfiziert, so dass die Expression sowohl von HA-markiertem als auch V5-markiertem A3C gewährleistet war. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen. Bevor das Zelllysate für die Immunopräzipitation der HA-markierten A3-Proteine verwendet wurde, sollte mittels Immunoblotanalysen die Expression von A3A-HA bzw. A3C-HA, A3C-V5, L1-ORF1p und β -Aktin in den Zelllysaten überprüft werden (Abb. 34A). Die Immunoblotanalyse der Expression von β -Aktin mit dem α - β -Aktin-Antikörper ergab, dass in jeder Spur annähernd gleiche Mengen Zelllysate aufgetrennt wurden. L1-ORF1p konnte in jedem Ansatz nachgewiesen werden, der mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} transfiziert wurde. A3A-HA, A3C-HA und A3C-V5 waren in den mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfizierten Ansätzen nachweisbar. Die Expression von A3C-HA war dabei im Vergleich zu A3A-HA verhältnismäßig gering. Trotzdem waren alle Proteine in für die Immunopräzipitation ausreichenden Mengen vorhanden. Lysat von 2102EP-Zellen, die L1-ORF1p endogen exprimieren, diente als Kontrolle für die erfolgreiche Detektion von L1-ORF1p. Die Kontrolle für eine erfolgreiche Detektion von HA-markierten Proteinen war ein Lysat von HeLa-Zellen, die in einem früheren Versuch erfolgreich mit dem A3A-HA-Expressionsplasmid sowie pJM101/L1_{RP} kotransfiziert wurden.

Um eine Interaktion zwischen L1-ORF1p und HA-markierten APOBEC-Proteinen nachzuweisen, wurden alle Zelllysate mit Hilfe der HA-Matrix präzipitiert (Kap. 2.4.5) und die Präzipitate anschließend in 30 µl IP-Probenpuffer resuspendiert. Jeweils 15 µl eines jeden resuspendierten Präzipitats wurden anschließend in einem 12 %-igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblotanalysen auf die Anwesenheit von A3A-HA bzw. A3C-HA, A3C-V5 und L1-ORF1p untersucht (Abb. 3.16B). Der Nachweis von A3A-HA (25 kDa; Spur 1 und 2, Abb. 34B) sowie von A3C-HA (22 kDa; Spur 3, 4 und 7, Abb. 34B) zeigte, dass die Immunopräzipitation mit der HA-Matrix gelungen war. Der Nachweis von A3C-V5 (27 kDa; Spur 7, Abb. 34B) bestätigte, dass die Versuchsbedingungen die Bildung von A3C-Dimeren und somit stabile A3C-Protein-Interaktionen ermöglichten. L1-ORF1p (40 kDa) war nur in der Positivkontrolle (2102EP-Lysat) detektierbar. Da L1-ORF1p weder mit A3A-HA noch mit A3C-HA kopräzipitiert wurde, gibt es keine Hinweise auf eine direkte Interaktion von L1-ORF1p mit A3A oder A3C.

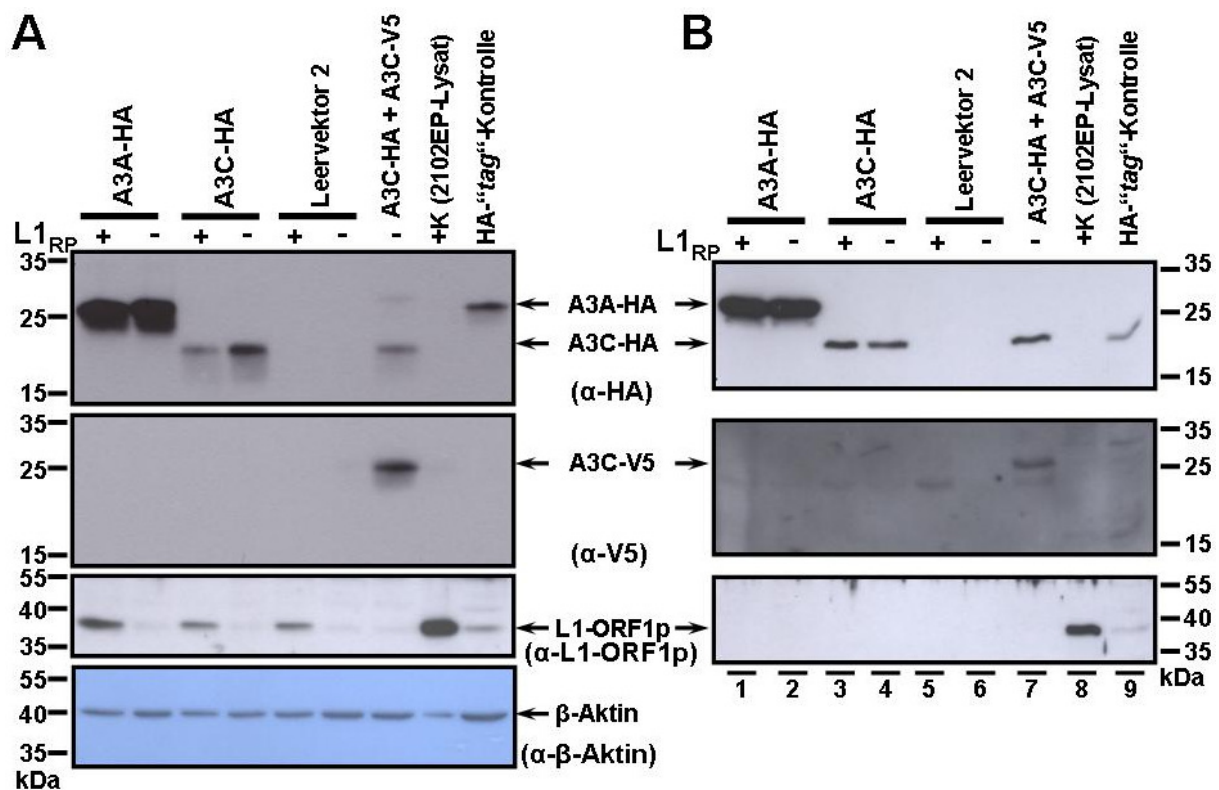


Abbildung 34: Immunoblotanalysen der Immunopräzipitate liefern keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen A3A bzw. A3C und L1-ORF1p, das von einem funktionellen L1-Element exprimiert wurde. (A) Immunoblotanalyse der Zelllysate von HeLa-Zellen, die nacheinander mit dem L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} bzw. mit dem Leervektor pCEP4 und dem A3A-HA- bzw. A3C-HA-Expressionsplasmid transfiziert wurden. Die Expression der Proteine A3A-HA (MW ~ 25 kDa), A3C-HA (MW ~ 22 kDa), A3C-V5 (MW ~ 27 kDa) und L1-ORF1p (MW ~ 40 kDa) und β-Aktin (MW ~ 42 kDa) wurde mit den Antikörpern α-HA, α-V5, α-L1-ORF1p und α-β-Aktin nachgewiesen. Leervektor 2, pcDNA3.1/Zeo(+). (B) Immunoblotanalyse der präzipitierten bzw. kopräzipitierten Proteine. Mit Hilfe der HA-Matrix wurden A3A-HA und A3C-HA bzw. mit A3A-HA bzw. A3C-HA assoziierte Proteinkomplexe präzipitiert. Die Präzipitate wurden im 12 %-PAA-Gel aufgetrennt und durch Immunoblotanalysen mit α-L1-ORF1p-, α-HA- bzw. α-V5-Antikörpern auf Anwesenheit von L1-ORF1p, A3A-HA bzw. A3C-HA und A3C-V5 untersucht. Nachweis von A3C-V5-spezifischem Signal ausschließlich in Spur 7 (27 kDa). Positivkontrolle in Spur 8: 20 µg Zellextrakt aus 2102EP-Zellen, die endogenes L1-ORF1p exprimieren. Positivkontrolle in Spur 9: 20 µg Zellextrakt aus HeLa-Zellen, in denen A3A-HA und L1-ORF1p in früheren Experimenten erfolgreich exprimiert worden waren.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.5.3 zeigten, dass L1-ORF1p weder als FLAG-markiertes Protein allein noch im Kontext aller L1-kodierten Genprodukte mit A3A oder A3C kopräzipitiert werden konnte. Die erfolgreiche Kopräzipitation von V5-markiertem A3C mit A3C-HA spricht gegen falsche Präzipitationsbedingungen als Ursache für den fehlenden Nachweis einer A3C/L1-ORF1p-Interaktion. Es gibt somit bisher keinen Hinweis für eine direkte Interaktion zwischen L1-ORF1p und A3A bzw. A3C. Diese Ergebnisse stellen jedoch keinen Widerspruch zur beschriebenen Kolo-kalisation von L1-ORF1p und A3C dar, die mittels Saccharosegradienten (Kap. 3.5.1, S.76) und Immunofluoreszenzanalysen (Kap. 3.5.2, S. 78) nachgewiesen wurde. Der fehlende Nachweis für eine direkte Interaktion zwischen L1-ORF1p und A3C, trotz nachgewiesener kolo-kalisation beider Proteine, ließe

sich durch eine mögliche direkte Interaktion zwischen A3C und anderen Komponenten der L1-RNPs, nämlich L1-RNA und/oder L1-ORF2p erklären.

3.5.4 Prüfung einer möglichen Interaktion zwischen APOBEC3A bzw. APOBEC3C und L1-ORF2p

Die beobachtete Kolokalisation von A3C und L1-ORF1p im Zytoplasma von 143B-Zellen (Abb. 32C), die nicht auf einer direkten Interaktion zwischen A3C und L1-ORF1p beruht, spricht für eine Inkorporation von A3C in L1-RNPs, die durch eine Interaktion zwischen A3C und L1-RNA bzw. A3C und L1-ORF2p vermittelt wird.

Um zu prüfen, ob A3C mit L1-ORF2p interagieren kann, sollten HA-markierte A3A- bzw. A3C-Proteine und FLAG-markiertes L1-ORF2p überexprimiert werden und anschließend ihre mögliche Interaktion in Immunopräzipitationsexperimenten untersucht werden. Dazu wurden zunächst 3×10^5 HeLa-Zellen je Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und zwei Tage später mit je 5×10^5 pfu / ml (MOI = 1) MVA/T7RP (Kap. 2.3.5) infiziert. Eine Stunde später folgte die Kotransfektion mit dem FLAG-L1-ORF2p-Expressionsvektor pMini-FLAG-ORF2 (Abb. 12B) und dem A3A- bzw. A3C-Expressionsplasmid (Abb. 13) an. Um darauf zu kontrollieren, dass die Präzipitationsbedingungen stabile Protein-Protein-Interaktion mit A3C erlaubten, wurden in einem Kontrollansatz, wie bereits in Kapitel 3.5.3 beschrieben, die A3C-Expressionsplasmide pcA3C-HA.Zeo und pcDNA3.1-APOBEC3C-V5-6xHis (Abb. 14) kotransfiziert. Das gewährleistete die Bildung von A3C-Dimeren aus HA- und V5-markiertem A3C-Proteinen. Ca. 16 Stunden nach der Infektion folgte die Lyse der Zellen. Als Positivkontrolle für erfolgreiche Detektion des FLAG-„tags“ diente Zellextrakt aus Zellen, die in einem früheren Experiment erfolgreich mit dem A3A-HA-Expressionsplasmid bzw. mit pMini-FLAG-ORF1 (Abb. 12A) transfiziert und mit MVA/T7RP infiziert worden waren.

Mittels Immunoblotanalyse wurde die Expression von T7-RNA-Polymerase, FLAG-L1-ORF2p sowie von A3C-V5 in den Zelllysaten ermittelt (Abb. 35). Die Immunoblotanalyse zeigte, dass die für die Expression von FLAG-L1-ORF2p essentielle T7-RNA-Polymerase vom MVA/T7RP-System in jedem Zelllysate exprimiert wurde. Ebenso war in dem Zelllysate, welches für die Kopräzipitation von A3C-V5- und A3C-HA-Proteinen herangezogen werden sollte, das V5-markierte A3C detektierbar. Folglich waren sowohl die Infektion mit MVA/T7RP als auch die anschließende Kotransfektion mit dem A3C-V5-Expressionsplasmid erfolgreich. Trotzdem konnte die Expression von FLAG-L1-ORF2p in keinem der verschiedenen Zelllysate nachgewiesen werden. Der Grund für die fehlgeschlagene Expression von FLAG-L1-ORF2p könnte in dessen Zytotoxizität liegen, weshalb die FLAG-L1-ORF2p-exprimierenden Zellen zum Zeitpunkt der Herstellung der Zelllysate (16 h nach Infektion) vielleicht schon abgestorben waren. Aufgrund der erfolglosen Bemühungen,

FLAG-L1-ORF2p mit Hilfe des MVA/T7RP-Systems zu exprimieren, um es dann in Immunopräzipitationsexperimenten einzusetzen, wurde sowohl auf die Immunoblotanalyse zum Nachweis der Expression von A3A-HA bzw. A3C-HA als auch auf die geplante nachfolgende Immunopräzipitation verzichtet.

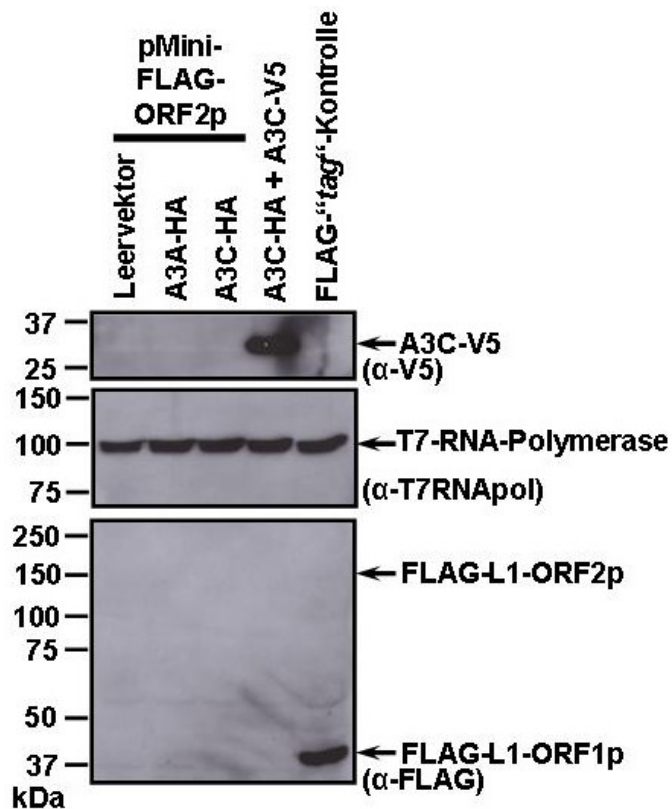


Abbildung 35: Immunoblotanalysen von HeLa-Zelllysaten als Nachweis der fehlgeschlagenen Expression von FLAG-L1-ORF2p. HA-markierte A3A- bzw. A3C-Proteine sollten in HeLa-Zellen zusammen mit FLAG-L1-ORF2p (Kotransfektion mit pMini-FLAG-ORF2) exprimiert werden. Die Expression von A3C-V5 (MW ~ 27 kDa), T7-RNA-Polymerase (MW ~ 100 kDa) und FLAG-L1-ORF1p (MW ~ 40 kDa, FLAG-„tag“-Kontrolle) konnte mit den Antikörpern α-V5, α-T7RNAPol und α-FLAG nachgewiesen werden. Die Expression von FLAG-L1-ORF2p (MW ~ 150 kDa; α-FLAG) konnte in keinem der Zelllysate nachgewiesen werden. Die FLAG-„tag“-Kontrolle war ein Lysat von HeLa-Zellen aus einem früheren Experiment, die mit dem Expressionplasmid für FLAG-L1-ORF1p transfiziert und mit MVA/T7RP infiziert wurden. Leervektor, pcDNA3.1/Zeo(+).

3.6 Bestimmung des inhibitorischen Effekts von AID, APOBEC1 und APOBEC2 auf die L1-Retrotranspositionsaktivität

APOBEC3-Proteine hemmen die virale Replikation durch die Deaminierung von Cytosinen in der viralen Minusstrang-cDNA. Für die Deaminierungsreaktion sind die konservierten Aminosäuren der Deaminasedomäne verantwortlich (Chiu und Greene, 2008). Auch die anderen Mitglieder der menschlichen APOBEC-Familie (AID, A1, A2 und A4) besitzen diese Deaminasedomäne (Harris und Liddament, 2004). Deshalb wäre es möglich, dass auch diese Proteine neben ihren bisher bekannten Funktionen (S. 18) auch die L1-Retrotransposition inhibieren können.

Um den Einfluß von AID, A1 und A2 auf die L1-Retrotranspositionsrate zu überprüfen, wurden L1-Retrotranspositionsreporterassays (Kap. 2.3.4) durchgeführt. Dafür wurde das L1-Reporterplasmid pJM101/L1_{RP} (Abb. 10) zusammen mit je einem Expressionsplasmid, welches AID, A1 oder A2 (Abb. 15) exprimiert, in HeLa-Zellen kotransfiziert. Um den Einfluß der verschiedenen APOBEC-Proteine auf die L1-Retrotranspositionsrate quantifizieren zu

können, diente die L1-Retrotranspositionsrate, die aus einem Ansatz resultierte, in dem das L1-Reporterplasmid mit dem leeren APOBEC-Expressionsvektor pcDNA4-V5-His B (Invitrogen, Karlsruhe) kotransfiziert wurde, als Positivkontrolle und wurde als 100 % Retrotranspositionsrate definiert. Um auf eine erfolgreiche Genitacinselektion zu kontrollieren, wurde das AID-Expressionsplasmid mit dem L1-Reporterplasmid pJM105 kotransfiziert, das ein inaktives L1-Reporterelement exprimiert (S. 28). Eine Selektion auf L1-Retrotranspositionseignisse war dann erfolgreich abgeschlossen, wenn keine Zellen oder Kolonien auf der Zellkulturplatte überlebt hatten, die mit pJM105 kotransfiziert wurden.

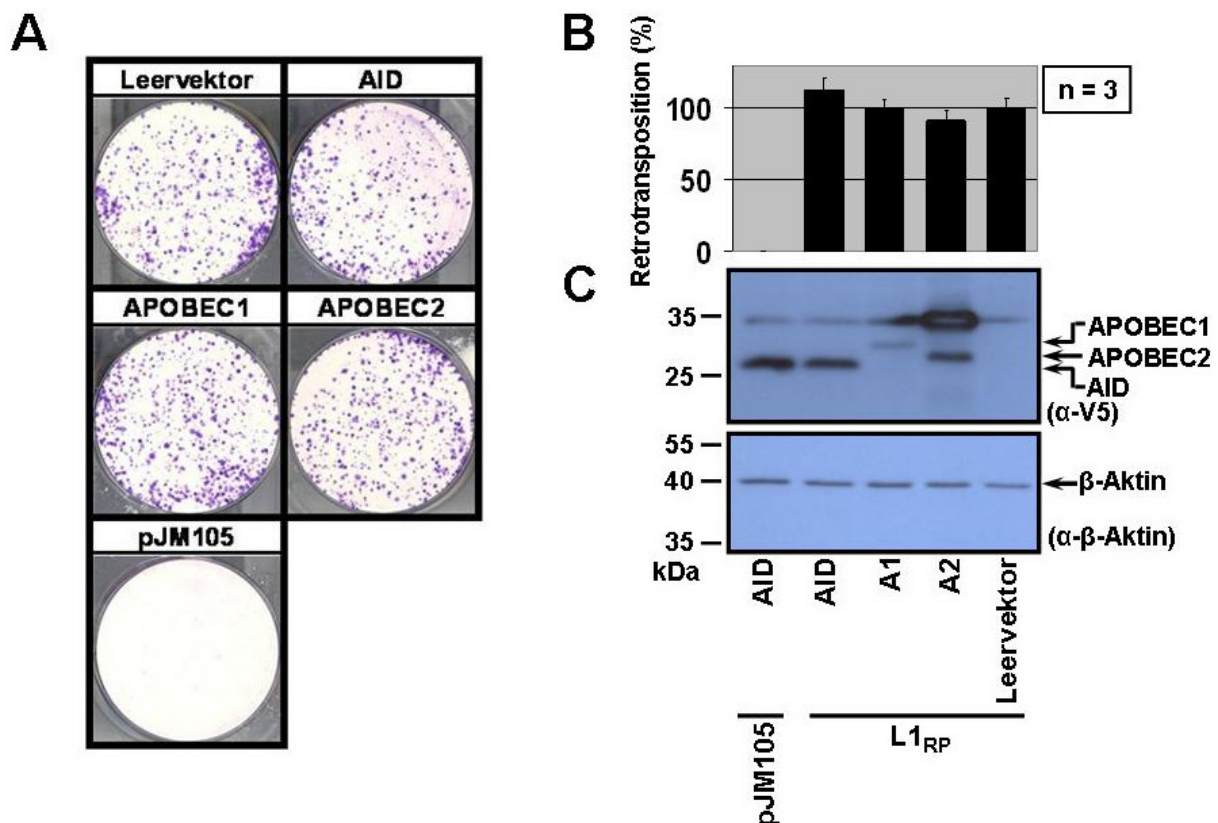


Abbildung 36: Auswirkungen der Überexpression von AID, APOBEC1 und APOBEC2 auf die L1-Retrotranspositionsrate. Weder AID noch A1 oder A2 beeinflussten die L1-Retrotransposition in signifikantem Ausmaß. **(A)** L1-Retrotranspositionsreporterassay in der Gegenwart der überexprimierten APOBEC-Proteine AID, APOBEC1 und APOBEC2. **(B)** Balkendiagramm zur Darstellung der relativen L1-Retrotranspositionsraten bei Anwesenheit von überexprimiertem AID, A1 und A2. Die Anzahl an Retrotranspositionseignissen, die sich aus der Kotransfektion des L1-Reporterplasmids mit dem leeren APOBEC-Expressionsvektor pcDNA4-V5-His B ergab, wurde als 100 % definiert. **(C)** Immunoblotanalyse zum Nachweis der Expression von AID (MW ~ 27 kDa), A1 (MW ~ 31 kDa) bzw. A2 (MW ~ 30 kDa) unter Verwendung des α-V5-„tag“-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente die β-Aktinexpression (MW ~ 42 kDa).

Sämtliche Zellextrakte, die für Immunoblotanalysen herangezogen wurden, wurden zwei Tage nach Kotransfektion geerntet. Die Immunoblotanalyse ergab, dass AID (~ 27 kDa) und A2 (~ 30 kDa) etwa gleich stark exprimiert wurden (Abb. 36C). Im Vergleich dazu zeigte A1 (~ 31 kDa) eine schwächere Expression. Weder AID noch A1 oder A2 waren in der Lage, einen signifikanten inhibierenden Effekt auf die L1-Retrotranspositionsrate auszuüben (Abb.

36B). Der fehlende Einfluß der AID auf die L1-Retrotranspositionrate steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Macduff *et al.* (2009), die eine AID-bedingte Hemmung der L1-Retrotransposition um 80 % zeigten.

4 Diskussion

Mehr als 30 % des menschlichen Genoms sind durch die Aktivität von LINE-1-Retrotransposons entstanden. Dieser formende Einfluss von L1 besteht auch heutzutage noch. L1-vermittelte Retrotransition in Keimzellen, Stammzellen und somatischen Zellen kann jedoch auch genetische und Tumorerkrankungen hervorrufen bzw. zu ihrer Entstehung beitragen. Daher wurde im Laufe der Evolution von der Wirtszelle eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um die schädigende L1-Aktivität in Schach zu halten. Zu diesen Mechanismen der intrazellulären Verteidigung gegen die L1-Aktivität gehören die Regulierung der Transkription durch Methylierungen und Histonmodifikationen im Bereich des L1-Promotors, sowie Transkriptionsfaktoren und vorzeitige Termination der Transkription und ineffiziente Transkriptelongation. Weiterhin wird die L1-Aktivität durch die Regulierung der Stabilität der L1-mRNA mittels RNA-Interferenz sowie durch die Regulierung der L1-Integration mittels TPRT durch verschiedene DNA-Reparaturenzyme kontrolliert. Seit dem Jahr 2006 ist bekannt, dass Mitglieder der APOBEC3-Proteinfamilie eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Verteidigung der Wirtszelle gegen L1-vermittelte Retrotransposition spielen. Es war das Ziel dieser Dissertation, den Mechanismus der durch APOBEC3-Proteine vermittelten Inhibition der L1-Aktivität aufzuklären.

4.1 Eine Hypothese zur deaminaseabhängigen Hemmung der L1-Retrotranspositionsrate durch APOBEC3-Proteine mit Hilfe von Faktoren des zellulären „*Base Excision Repair*“-Weges

Als Sheehy *et al.* (2002) zeigten, dass A3G in der Lage ist, HIV Δ *vif* zu inhibieren, markierte das den Anfang einer Vielzahl von Arbeiten, welche die enorme Bedeutung der antiviralen Aktivität der APOBEC-Proteine aufzeigten. A3G wird dabei in die HIV-Partikel eingebaut und anschließend in die Zielzellen transportiert (Mariani *et al.*, 2003). In den Zielzellen wird die HIV-RNA revers transkribiert. Die Cytosine in der dabei entstandenen einzelsträngigen cDNA werden durch A3G zu Uracilen deaminiert. Die Folge ist die Einführung von G-zu-A-Hypermutationen in die provirale DNA, die zur Inaktivierung des Virus führt (Suspeene *et al.*, 2004). Da die Einführung der Hypermutationen durch A3G während der reversen Transkription der HIV-RNA stattfindet und auch der L1-Retrotranspositionsvorgang über reverse Transkription der L1-RNA abläuft (Kap. 1.1.6, S. 12), wurde vermutet, dass L1-Retrotransposition auch durch APOBEC3-Proteine reguliert sein könnte. Diese Vermutung wurde beinahe gleichzeitig durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt, denn sie konnten mit Hilfe von L1-Reporterelementen zeigen, dass alle sieben Mitglieder der menschlichen

APOBEC3-Familie deren Retrotranspositionsrate um 30 bis 95 % reduzieren können (Bogerd *et al.*, 2006; Muckenfuß *et al.*, 2006; Stenglein und Harris, 2006; Kinomoto *et al.*, 2007; OhAinle *et al.*, 2008; MacDuff *et al.*, 2009). Allerdings konnten in *de novo* L1-Insertionen, die in Anwesenheit von A3-Proteinen stattgefunden hatten, keine G-zu-A-Hypermutationen nachgewiesen werden, die auf die Deaminaseaktivität der A3-Proteine zurückgeführt werden könnten (Bogerd *et al.*, 2006; Muckenfuß *et al.*, 2006; Stenglein und Harris, 2006; Kinomoto *et al.*, 2007; OhAinle *et al.*, 2008; MacDuff *et al.*, 2009; Kapitel 1.2.2). Somit war unklar, über welchen Mechanismus A3-Proteine die L1-Aktivität inhibieren.

Die Deaminierung von Cytosinen in einer entstehenden cDNA führt zur Generierung von Uracilen in dieser cDNA. Diese Uracile werden vom zellulären „*Base Excision Repair*“-Weg erkannt und durch die korrekte Base Cytosin ersetzt (Kap. 1.3). Einige in diesen Reparaturweg involvierte Enzyme wurden auch in HIV-Partikeln nachgewiesen (Priet *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007). Deshalb schlugen Harris *et al.* (2003) vor, dass BER-Faktoren in die APOBEC3-vermittelte retrovirale Hemmung involviert sind. Bedenkt man, dass A3G die Editierung an retroviraler einzelsträngiger (ss) DNA vornimmt (Suspene *et al.*, 2004) und dass L1 nur während des TPRT-Prozesses, der im Zellkern stattfindet, als ssDNA vorliegt (Cost *et al.*, 2002), so könnten APOBEC3-Proteine eine mögliche Deaminaseaktivität gegen L1 nur während des TPRT-Prozesses ausüben. Auf diesen Grundlagen wurde eine Hypothese zur deaminaseabhängigen Hemmung von L1 durch APOBEC3-Proteine unter Beteiligung des zellulären BER-Weges entwickelt (Kap. 3.1):

Die Integration von L1 in das Genom mittels TPRT beginnt mit dem Schneiden des ersten genomischen DNA-Stranges, gefolgt vom Anlagern der L1-RNA und der Synthese der L1-cDNA (Abb. 4). Gemäß der Hypothese deaminiert anschließend APOBEC3 ein Cytosin in der L1-cDNA. Das dabei entstandene Uracil wird von einer Uracil-DNA-Glykosylase erkannt. Diese entfernt das Uracil. An der so erzeugten AP-Stelle schneidet eine AP-Endonuklease anschließend das Phosphat-Zucker-Rückgrat der DNA. Als beteiligte BER-Enzyme kommen die beiden Uracil-DNA-Glykosylasen UNG2 und SMUG1 sowie die AP-Endonukleasen APE1 und APE2 in Frage. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse von Priet *et al.* (2003) und Yang *et al.* (2007). Beide Gruppen wiesen nach, dass UNG2 und APE1 in HIV-Partikel verpackt werden und an der Degradation der durch A3G mutierten HIV-cDNA beteiligt sind. Im Gegensatz dazu zeigten Kaiser und Emerman (2006), dass der HIV Δ vif-hemmende Effekt von A3G nicht beeinflusst wird, wenn UNG2 mit Hilfe des Inhibitors UGI inaktiviert wird oder wenn die HIV-Partikel von Zellen produziert werden, die aufgrund einer Deletion im zweiten Exon des *ung*-Gens kein funktionelles UNG2 produzieren können. Aus diesen Daten folgerten sie, dass BER-Enzyme nicht an der Inhibition von HIV durch A3G beteiligt sind. Die beiden anderen wichtigen menschlichen Uracil-DNA-Glykosylasen TDG und MBD4 verwenden nur doppelsträngige (ds) DNA als Substrat (Hendrich *et al.*, 1999; Abu

und Waters, 2003) und kommen deshalb für eine Editierung der einzelsträngigen L1-cDNA gemäß unserer Arbeitshypothese nicht in Frage. Um die Beteiligung von BER-Enzymen an einer APOBEC-bedingten Deaminierung von Cytosinen in der L1-cDNA zu überprüfen, könnten die Uracil-DNA-Glykosylasen UNG2 und SMUG1 sowie die AP-Endonuklease APE1 mittels siRNAs zeitweilig ausgeschaltet werden. Für UNG2 wäre außerdem eine Inaktivierung durch den Inhibitor UGI möglich. Ist der BER-Weg tatsächlich an der APOBEC-vermittelten Inhibierung der L1-Retrotransposition beteiligt, sollten *de novo* L1-Integrationsereignisse aus Zellen mit inaktiviertem BER-Weg eine größere Insertionslänge besitzen. Außerdem sollten APOBEC-spezifische G-zu-A-Mutationen in der L1-Sequenz nachzuweisen sein.

Eine wichtige Konsequenz der Hypothese ist die Erzeugung 5'-verkürzter *de novo* L1-Insertionen. Gemäß unserer Hypothese entstehen diese durch das Schneiden des Phosphat-Zucker-Rückgrades der L1-cDNA an der AP-Stelle durch eine AP-Endonuklease (Abb. 18). Die Folge sind 3'-verkürzte L1-cDNAs, die nach der Zweitstrangsynthese zu 5'-verkürzten L1-Insertionen führen. Die Hypothese wird hier durch die Ergebnisse von Szak *et al.* (2002) unterstützt, wonach 85 % aller genomischen L1-Kopien an ihrem 5'-Ende verkürzt sind und die Mehrheit dieser 5'-verkürzten L1-Elemente im Bereich des 3'-Endes von L1-ORF2 oder innerhalb der 3'-UTR endet. Die Struktur der verkürzten endogenen L1-Elemente, die seit langem im menschlichen Genom vorliegen, wird bestätigt durch die Struktur von 142 *de novo* L1-Insertionen, die aus L1-Retrotranspositionsreporterassays in Zellkultur entstanden sind: Auch 93 % dieser *de novo* Insertionen zeichnen sich durch Verkürzungen an ihren 5'-Enden aus (Gilbert *et al.*, 2002; Symer *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2005). Eine Ursache für diese Verkürzungen könnte gemäß unserer Arbeitshypothese die Aktivität von APOBEC3-Proteinen sein, die in den verwendeten Zelllinien nachweislich exprimiert werden (Muckenfuß *et al.*, 2006; Schumann, 2007).

Sollten APOBEC3-Proteine die L1-Aktivität gemäß unserer Hypothese inhibieren, könnte ein evolutionärer Druck zur Bevorzugung G/C-armer Codons in den L1-Sequenzen die Folge sein. Dadurch wären weniger Möglichkeiten zur Deaminierung von Cytosinen durch APOBEC3-Proteine gegeben. Diese Überlegung wird dadurch unterstützt, dass der G/C-Gehalt innerhalb eines vollständigen L1-Elements stark variiert (Scott *et al.*, 1987). Während sich die 5'-UTR und die 3'-UTR durch einen G/C-Gehalt von 58 % bzw. 48 % auszeichnen, beträgt der G/C-Gehalt der ORFs weniger als 40 %. Im Vergleich dazu liegt der G/C-Gehalt des gesamten menschlichen Genoms bei 41 % sowie für die meisten Gene zwischen 40 und 52 % (Lander *et al.*, 2001). Diese Fakten unterstützen die Überlegung, dass, bedingt durch die APOBEC3-Aktivität, die L1-ORFs einer Selektion auf A/T-reiche Sequenzen unterliegen. Andererseits besitzt ein vollständiges L1-Element vor allem an seinen Enden eine Vielzahl potentieller APOBEC3-Deaminierungsstellen. In der 5-UTR haben G-zu-A-Mutationen

möglicherweise keinen negativen Auswirkungen auf den L1-Promotor, so dass dadurch kein Selektionsdruck auf A/T-reiche Sequenzen besteht. In der 3'-UTR könnten G-zu-A-Mutationen keine wichtigen regulatorischen Sequenzen beeinflussen, wodurch auch hier kein Selektionsdruck für A/T-reiche Sequenzen auftritt.

Ein bestechender Aspekt der Arbeitshypothese ist, dass sich mit ihr die Abwesenheit von G-zu-A-Mutationen trotz stattgefundener Deaminierung von Cytosinen erklären läßt: Gemäß unserem Modell definiert die Position des deaminierten Cytosins auch die Nukleobasenposition, an deren 5'-Seite die AP-Endonuklease die L1-cDNA schneidet (Abb. 18). Somit endet der cDNA-Strang unmittelbar vor der mutierten Nukleobase, die damit auch nicht mehr Teil der neu integrierten L1-Kopie ist. Muckenfuß *et al.* (2006) wiesen die Abwesenheit von G-zu-A-Hypermutationen in *de novo* L1-Insertionen, die in Anwesenheit von A3A, A3B, A3C bzw. A3G entstanden, durch die Sequenzierung von L1_{mneo}-spezifischen PCR-Produkten nach, die auch einen großen Teil der Neomycin-Phosphotransferase (Neo^R)-Kassette umfaßten. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die L1-Reporterassay-bedingte Geneticinselektion solche HeLa-Zellen mit mutierten und damit inaktivierten, integrierten Neo^R-Kassetten durch Selektion aus der Kultur entfernt wurden. Allerdings spricht gegen dieses Szenario die Beobachtung, dass auch in solchen L1-Retrotranspositionsreporterassays, in denen das *egfp*-Gen als Reportergen für *de novo* L1-Retrotransposition herangezogen wurde, keine G-zu-A-Hypermutationen in Anwesenheit von überexprimiertem A3B und A3F detektiert werden konnten (Stenglein und Harris, 2006). Auch Kinomoto *et al.* (2007) berichten von der Abwesenheit von G-zu-A-Hypermutationen in solchen *de novo* L1-Retrotranspositionseignissen, die unter Anwesenheit von A3G und anderen APOBEC3-Proteinen stattgefunden haben.

Die in Kapitel 3.2 beschriebenen *in silico*-Analysen der 5'-Übergänge von endogenen sowie *de novo* L1-Insertionen zeigten, dass Guanin als erste fehlende Nukleobase am 5'-Ende von 5'-verkürzten L1-Insertionen statistisch signifikant überrepräsentiert ist. Dieses Ergebnis ist konsistent mit unserer Hypothese, wonach A3-Proteine über Deaminierung von Cytosinen in Kombination mit der Aktivität von BER-Faktoren die *de novo* L1-Retrotranspositionshäufigkeit verringern (Abb. 18). Allerdings ist Guanin als erste fehlende Base im Falle bereits vorhandener 5'-verkürzter L1-Insertionen weniger stark überrepräsentiert als im Falle von *de novo* L1-Insertionen, die in der Zellkultur generiert wurden (Abb. 19 und Abb. 20). Ein Grund hierfür ist, dass die in Zellkulturexperimenten generierten *de novo* Insertionen nur wenige Wochen alt waren, als ihre Sequenzen analysiert wurden, und die Sequenzen in diesem kurzen Zeitraum kaum oder gar nicht durch Mutationen verändert wurden. Im Gegensatz dazu waren die von uns untersuchten endogenen, seit 5 – 60 Millionen Jahren im Genom manifestierten L1-Sequenzen (Zingler *et al.*, 2005a) in diesem Zeitraum unzähligen Mutationseignissen ausgesetzt. Daher steht

fest, dass auch die Nukleotidsequenzen der 5'-Übergänge der untersuchten endogenen L1-Elemente im Laufe der Evolution durch eine Vielzahl von Mutationen modifiziert wurden. So konnte in vielen Fällen aufgrund von Mutationen in den TSDs das ursprüngliche 5'-Ende der L1-Insertion von der flankierenden genomischen Sequenz nicht mehr fehlerfrei unterschieden werden. Zusätzlich zu dem in unserer Arbeitshypothese postulierten Mechanismus der 5'-Verkürzung von L1-Elementen wurden auch andere Mechanismen vorgeschlagen, welche die Entstehung 5'-verkürzter L1-Insertionen erklären könnten: 1. Das Auftreten von 1 bis 12 Nukleotiden umfassenden Mikrohomologien an den 5'-Übergängen 5'-verkürzter L1-Kopien spricht für die Beteiligung von zellulären Faktoren des „*NonHomologous End-Joining*“-(NHEJ)-Weges der Doppelstrangbruchreparatur an der Entstehung 5'-verkürzter L1-Insertionen (Martin *et al.*, 2005; Zingler *et al.*, 2005). 2. 5'-verkürzte L1-Insertionen könnten alternativ auf die geringe Prozessivität der L1-RT zurückzuführen sein. Es wurde diskutiert, dass L1-ORF2p während des Prozesses der reversen Transkription wegen der Ausbildung von „*stem-loop*“-Strukturen in der L1-mRNA vorzeitig von der L1-RNA abfällt, oder aufgrund der Konkurrenz mit einer zellulären RNase von der L1-RNA verdrängt wird (Ostertag und Kazazian, 2002). 3. Als dritte Möglichkeit wurde das sogenannte „*template jumping*“ diskutiert. Dabei wechselt L1-ORF2p während der cDNA-Synthese von der L1-RNA auf das freie 3'-Ende der gespaltenen genomischen Ziel-DNA und beendet so vorzeitig die cDNA-Synthese der L1-RNA, auf der L1-ORF2p ursprünglich lokalisiert war (Bibillo und Eickbush, 2002).

Unsere Analyse der 5'-Enden endogener 5'-verkürzter L1-Insertionen (S. 56) ergab auch, dass Cytosine als endständige Nukleobasen am 5'-Ende der integrierten L1-cDNA überrepräsentiert waren (Abb. 20). Um zu entscheiden, ob dieser Sachverhalt unsere Arbeitshypothese stärkt, ist ein Blick auf die von den APOBEC3-Proteinen bevorzugt mutierten Sequenzmotive innerhalb retroviraler Genome nötig. Während einige Arbeitsgruppen im Falle der A3G-vermittelten Deaminierung von Cytosinen in HIVΔ*vif* „GG“-Dinukleotide als bevorzugte Mutationsstellen beschrieben (Bishop *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2004), wurden kürzlich „GA“-Dinukleotide als am häufigsten mutierte Motive identifiziert (Henry *et al.*, 2009). Der Grund für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse liegt darin, dass in HIVΔ*vif* „GA“-Dinukleotide häufiger auftreten als andere „GX“-Dinukleotide, während im HBV-Genom „GG“-Dinukleotide überrepräsentiert sind (Abb. 37). Aus diesem Grund identifizierten Henry *et al.* (2009) das „GA“-Dinukleotid als das von A3G am häufigsten mutierte Dinukleotid der HIVΔ*vif*-Sequenz, während das „GG“-Dinukleotid innerhalb der HBV-Sequenz am häufigsten mutiert wurde (Abb. 37B). Betrachtet man die Häufigkeit des Auftretens der vier verschiedenen Nukleobasen am 5'-Übergang 5'-verkürzter L1-Insertionen (Abb. 37D), so stellt man fest, dass nicht nur Guanin sondern alle vier Nukleobasen an dieser Position auftreten können. Dieser Sachverhalt ließe sich dadurch

erklären, dass vermutlich nicht nur die über A3-Proteine vermittelte Hemmung von L1 Einfluß auf die Lokalisierung der Abbruchstelle am 5'-Ende der L1-Insertion nimmt, sondern auch die oben erwähnten drei weiteren, APOBEC-unabhängigen Mechanismen zu einer 5'-Verkürzung der L1-Insertionen führen können. Cytosin war häufiger die endständige Base 5'-verkürzter L1-Elemente als man es aufgrund der L1-Nukleotidsequenz erwarten würde. Die Verteilung der „GX“-Dinukleotide in der 3'-UTR von L1, in der die meisten präexistierenden L1-Kopien abbrechen, ähnelt, im Gegensatz zur Situation im gesamten L1, der „GX“-Verteilung im HBV-Genom. Die Ergebnisse zur Dinukleotidpräferenz verschiedener APOBEC3-Proteine innerhalb des HBV-Genoms (Abb. 37C) zeigen, dass A3F auch bevorzugt „GC“-Dinukleotide mutiert und damit als Verursacher 5'-verkürzter genomischer L1-Elemente in Frage kommt (Henry *et al.*, 2009). AID, ein weiteres Mitglied der APOBEC-Familie, wies in *in vitro*-Assays eine Präferenz für „GC“- und „GT“-Dinukleotide auf (Kohli *et al.*, 2009). Da AID eines der evolutionär ältesten APOBEC-Proteine ist, und die Expression der AID-mRNA in murinen Oozyten nachgewiesen wurde (Morgan *et al.*, 2004), könnte die Überrepräsentation von Cytosinen als endständige Nukleobase 5'-verkürzter L1-Insertionen alternativ auch auf die Aktivität der AID zurückzuführen sein. Zusammenfassend bedeutet die ungefähre Gleichverteilung aller „GX“-Dinukleotide in der L1-3'-UTR, dass die APOBEC-Proteine einschließlich der AID eine Ursache für die hohe Anzahl an 5'-verkürzten L1-Kopien darstellen können. Auch dieser Punkt spricht für die Hypothese der Inhibierung der L1-Aktivität mittels Deaminaseaktivität der APOBECs und der BER-Enzyme.

4.2 Die deaminaseunabhängige Hemmung der L1-Aktivität durch APOBEC3C erfolgt über eine Interaktion mit RNA

APOBEC3C inhibiert LINE-1 unabhängig von seiner Deaminaseaktivität

Wenn A3C die L1-Retrotransposition gemäß unserer Arbeitshypothese (Abb. 18) hemmen würde, so wären A3C-Proteine mit Mutationen in der Deaminasedomäne nicht mehr in der Lage, die L1-Aktivität zu hemmen (Henry *et al.*, 2009). Um das zu prüfen, wurden L1-Retrotranspositionsreporterassays in Anwesenheit der vier Deaminasedomänenmutanten A3C-E68Q, A3C-C97S, A3C-C100S und A3C-H66R durchgeführt. Nur für A3C-C97S konnte bereits in einem *E. coli*-Mutationsassay (Harris *et al.*, 2002) gezeigt werden, dass diese Mutante nicht mehr in der Lage ist, Deaminierung von Cytosinen durchzuführen (Stauch *et al.*, 2009). Die Ergebnisse zeigten, dass A3C die L1-Retrotransposition unabhängig von seiner Deaminaseaktivität inhibierte. Dies ist das erste Beispiel für einen durch A3C vermittelten inhibitorischen Effekt, der deaminaseunabhängig ist. Alle anderen bisher beschriebenen inhibitorischen Effekte von A3C, wie zum Beispiel die Hemmung von SIV_{agm}Δvif (Yu *et al.*,

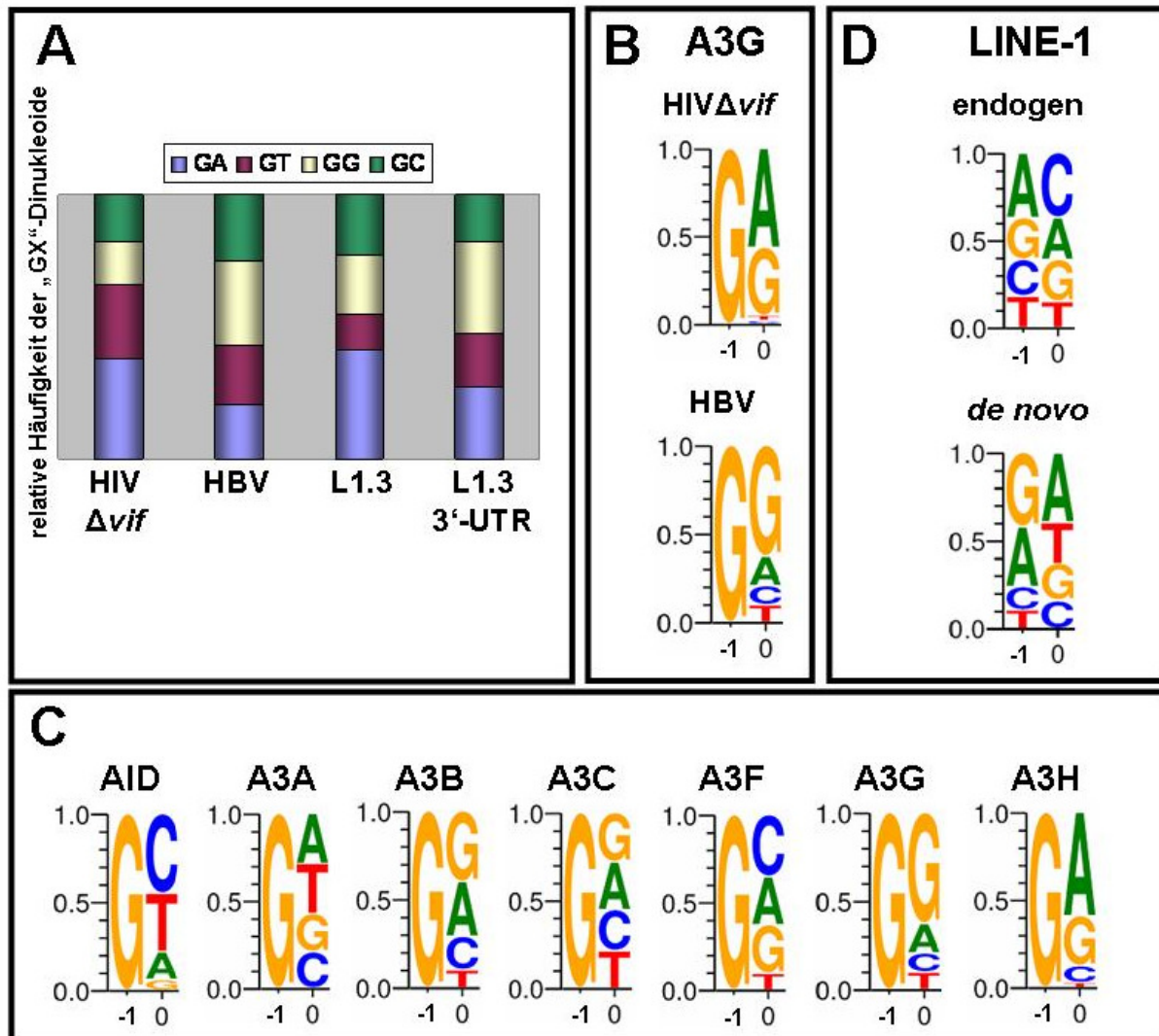


Abbildung 37: APOBEC-Proteine bevorzugen bestimmte Dinukleotide als Zielsequenz für die Deaminierung von Cytosinen. (A) Relative Häufigkeit der „GX“-Dinukleotide in den Genomen von HIV Δvif , HBV, L1.3 sowie in der 3'-UTR des aktiven L1-Elements L1.3. Während im HIV Δvif -Genom das „GA“-Dinukleotid am häufigsten auftritt, findet man im HBV-Genom „GG“ am häufigsten. Die Häufigkeit der verschiedenen „GX“-Dinukleotide in der 3'-UTR von L1.3 entspricht in etwa der von HBV, unterscheidet sich jedoch stärker von der im gesamten L1.3-Element sowie von HIV Δvif . (B) Sequenzlogos zeigen, dass A3G im HIV Δvif -Genom vorwiegend „GA“-Dinukleotide mutiert, während es im HBV-Genom überwiegend „GG“-Dinukleotide deaminiert. Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Häufigkeit beider Dinukleotide in beiden Genomen. (C) Sequenzlogos zu den Dinukleotidpräferenzen bei der Deaminierung von Cytosinen durch verschiedene APOBEC3-Proteine innerhalb des HBV-Genoms sowie durch AID in einem *in vitro*-Assay. (D) Sequenzlogos zur Auftrittswahrscheinlichkeit bestimmter Dinukleotidkombinationen an den 5'-Übergängen 5'-verkürzter L1-Insertionen. Da Cytosin als endständige Base endogener L1-Elemente überrepräsentiert ist, kommen aufgrund ihrer Dinukleotidpräferenz A3F und AID als Verursacher 5'-verkürzter L1-Insertionen in Frage. In 5'-verkürzten *de novo* L1-Insertionen ist Adenin die häufigste endständige Base. Dies könnte durch die Deaminaseaktivität von A3B, A3C oder A3H erklärt werden, die in HeLa-Zellen endogen exprimiert werden. Position -1: erstes fehlendes Nukleotid der L1-Sequenz, das an das endständige L1-Nukleotid (Position 0) der 5'-verkürzten L1-Sequenz unmittelbar angrenzt.

2004), HTLV (Mahiery *et al.*, 2005) sowie HIV Δvif und HBV (Henry *et al.*, 2009), wurden über Deaminierung von Cytosinen vermittelt. Die hier vorgefundenen G-zu-A-Hypermutationen zeigten, dass bei der Inhibition dieser Viren die Deaminierung von Cytosinen zumindest eine entscheidende Rolle spielte. Im Falle der A3C-vermittelten Hemmung von IAP und MusD

wurde bisher nicht untersucht, ob die Deaminaseaktivität bei der Hemmung eine Rolle spielt (Chen *et al.*, 2006).

Eine deaminaseunabhängige Hemmung der retroviralen Replikation konnte für A3G nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl A3G-WT als auch Deaminasedomänenmutanten von A3G die Initiation der reversen Transkription durch tRNA^{Lys3}-Primer verhindern können und außerdem zu einer Blockade der Elongation der HIV-cDNA führen (Guo *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2008). Die Blockade der Initiation der reversen Transkription führte zur Verringerung der Anzahl früher „*strong stop*“-cDNAs und später HIVΔ*vif*-cDNAs unabhängig von seiner Deaminaseaktivität. Weiterhin können sowohl A3F als auch A3G (aber nicht A3C) mit der HIV-Integrase interagieren und damit die Ausbildung des Präintegrationskomplexes sowie den nukleären Import der HIV-DNA behindern (Luo *et al.*, 2007). Chiu *et al.* (2006) zeigten, dass A3G die Retrotransposition von *Alu*-Elementen hemmen kann, indem es die *Alu*-RNA vermutlich in zytoplasmatische Komplexe sequestriert und somit von den L1-kodierten Proteinen fernhält, mit denen die *Alu*-RNA interagieren muß, um ihre Retrotransposition zu gewährleisten.

Da inzwischen gezeigt werden konnte, dass auch AID, A3B und A3G die L1-Retrotransposition unabhängig von ihrer Deaminaseaktivität hemmen (Macduff *et al.*, 2009), kann unsere Arbeitshypothese von der deaminaseabhängigen L1-Inhibition mit Hilfe der BER-Faktoren für AID, A3B, A3C und A3G nicht zutreffen.

Während A3C die L1-Retrotransposition unabhängig von seiner Deaminaseaktivität hemmte, zeigten Muckenfuß *et al.* (2006), dass die A3A-bedingte Hemmung von L1 von einer intakten Deaminasedomäne abhängt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass A3A und A3C, die sich beide durch nur eine Deaminasedomäne auszeichnen, die L1-Aktivität über unterschiedliche Mechanismen einschränken. Um diese unterschiedlichen Mechanismen genauer zu charakterisieren, wurde der Einfluß korrespondierender A3A- und A3C-Deaminasedomänenmutanten auf die L1-Aktivität im Retrotranspositionsreporterassay untersucht (Abb. 25). Im Gegensatz zu A3A-WT hatte die Anwesenheit von A3A-E72A und A3A-C101A/C106A keinerlei inhibitorischen Effekt auf die L1-Aktivität. A3A-C101A/C106A erhöhte sogar die L1-Retrotranspositionsrate um ca. 60 % und bestätigte damit teilweise die Daten, die in Muckenfuß *et al.* (2006) publiziert wurden. Die hier veröffentlichten Daten zeigten allerdings, dass beide Mutanten, A3A-E72A und A3A-C101A/C106A, die L1-Aktivität um 60 – 80 % steigern. Es wurde spekuliert, dass dieser fördernde Effekt auf einem dominant-negativen Effekt der A3A-Mutante gegenüber endogen exprimiertem A3B und A3C beruht. Die über die Deaminaseaktivität vermittelte Hemmung von L1 durch A3A wurde durch zwei weitere Arbeitsgruppen unter Verwendung der Mutanten A3A-E72Q und A3A-C106S bzw. A3A-E72A bestätigt (Chen *et al.*, 2006; Macduff *et al.*, 2009). Ein dominant-negativer Effekt wurde in diesen Fällen nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu waren die

korrespondierenden A3C-Mutanten A3C-E68Q und A3C-C97S/C100S in der Lage, die L1-Aktivität um 37 % bzw. 66 % zu hemmen (Abb. 25). Die unterschiedlichen Auswirkungen der korrespondierenden A3A- bzw. A3C-Mutanten (Abb. 24) bestätigten, dass A3A und A3C die L1-Retrotransposition über unterschiedliche Mechanismen inhibieren. Die bisherigen Daten zu den Auswirkungen von A3A und seinen Deaminasedomänenmutanten sind konsistent mit der Arbeitshypothese der Deaminierung unter Beteiligung von BER-Faktoren. Für A3DE, A3F und A3H konnte gezeigt werden, dass sie einerseits zur Deaminierung von Cytosinen in HIV-cDNA befähigt sind (Dang *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 2009) und andererseits die L1-Retrotransposition hemmen können (Muckenfuß *et al.*, 2006; Kinomoto *et al.*, 2007; OhAinle *et al.*, 2008). Der Einfluß von A3DE-, A3F- und A3H-Deaminasedomänenmutanten auf die L1-Aktivität wurde bisher noch nicht untersucht. Aber die Nukleotidverteilung an der 5'-Abbruchstelle 5'-verkürzter endogener L1-Elemente hat große Ähnlichkeit zur Dinukleotidpräferenz von A3F bei der Deaminierung von Cytosinen in HBV-cDNA (Abb. 37). Deshalb wäre es vorstellbar, dass A3DE, A3F und A3H die L1-Retrotransposition gemäß unserer Arbeitshypothese der Deaminierung der L1-cDNA mit Hilfe von BER-Faktoren hemmen.

Die Inhibition der LINE-1-Retrotransposition erfolgt durch APOBEC3C-Dimere

Die Kristallstruktur von APOBEC2 sowie die darauf aufbauenden Strukturmodelle von AID, A3C und A3G sind ein Hinweis darauf, dass die APOBEC-Proteine in ihrer aktiven Form als Dimere sowie vielleicht auch als Tetramere vorliegen (Prochnow *et al.*, 2007; Huthoff *et al.*, 2009; Stauch *et al.*, 2009). Um zu prüfen, ob die Ausbildung von A3C-Dimeren auch für die L1-Hemmung durch A3C essentiell ist, wurden die beiden Dimerisierungsmutanten A3C-F55A und A3C-W74A (Stauch *et al.*, 2009) auf ihren Einfluß auf die L1-Retrotranspositionsrate untersucht. Beide Mutanten waren im *E. coli*-Mutationsassay nicht in der Lage, G-zu-A-Mutationen zu katalysieren (Stauch *et al.*, 2009), und hatten auch keinerlei inhibitorische Wirkung auf die L1-Retrotranspositionsrate (Abb. 28). Dies zeigte, dass A3C sowohl für die Deaminaseaktivität als auch für die Hemmung der L1-Aktivität mindestens als Dimer vorliegen muß. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, dass A3C als Dimer vorliegen muß, um die Replikation von SIV_{agm}Δvif zu inhibieren (Stauch *et al.*, 2009).

Auch A3G kann nur als Dimer seine inhibitorische Wirkung ausüben. Es wurde gezeigt, dass A3G-Deletionsmutanten, die ihre Fähigkeit zur Dimerisierung verloren haben, nicht mehr in der Lage waren, die HIVΔvif-Replikation zu hemmen (Shindo *et al.*, 2003; Huthoff *et al.*, 2009). Dabei wurde demonstriert, dass A3G-Oligomerisierung ein RNA-abhängiger Vorgang ist (Huthoff *et al.*, 2009). Aufgrund eines AID-Strukturmodells wurde vermutet, dass AID Homodimere oder Homotetramere ausbildet (Prochnow *et al.*, 2007).

AID-Mutanten, die sich durch Mutationen in der hypothetischen Oligomerisierungsdomäne auszeichnen, verloren ihre Deaminaseaktivität (Prochnow *et al.*, 2007). Dimerisierung scheint generell eine Voraussetzung für die Aktivität von Enzymen zu sein, die Mutationen in Nukleinsäurestränge einführen. Sowohl APOBEC1 und APOBEC2, die keinerlei antiviralen Effekt haben, als auch ADAR1 und ADAR2, die Deaminierungen von Adeninen an doppelsträngiger RNA vornehmen, sind nur als Dimere aktiv (Navaratnom *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2003; Prochnow *et al.*, 2007).

Die Hemmung der L1-Retrotransposition durch APOBEC3C wird über die Interaktion von RNA mit APOBEC3C vermittelt

A3C besitzt eine Nukleinsäurebindetasche, deren Fähigkeit zur Interaktion mit RNA mittels der Mutationen K22A, R122A und N177A nachgewiesen wurde (Stauch *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, ob diese RNA-Bindetasche bei der L1-Inhibition durch A3C eine Rolle spielt, wurde der Einfluß der drei Mutanten A3C-K22A, A3C-R122A und A3C-N177A auf die L1-Retrotransposition mit Hilfe des L1-Retrotranspositionsreporterassays bestimmt. Während im Falle von A3C-N177A die Mutation keinerlei Auswirkungen auf den L1-inhibierenden Effekt hatte, hemmte A3C-K22A die L1-Retrotransposition nur noch um 29 % (Abb. 26). Beide Mutanten sind auch in der Lage, die SIV_{agm}Δ*vif*-Replikation im selben Maße wie A3C-WT zu inhibieren (Stauch *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu hob die R122A-Mutation den L1-inhibierenden Effekt von A3C vollständig auf. Dieselbe Mutation hob auch den inhibierenden Effekt von A3C gegenüber der Replikation des Lentivirus SIV_{agm}Δ*vif* auf (Stauch *et al.*, 2009). Die Autoren zeigten, dass dies auf die dramatisch verringerte Fähigkeit dieser Mutante zur RNA-Bindung zurückzuführen ist. Dadurch kann A3C-R122A wesentlich schlechter mit der Nukleokapsiddomäne des SIV_{agm}-Gag-Proteins interagieren, wodurch das Verpacken der A3C-Mutante in die Virionen stark beeinträchtigt ist. Interessanterweise ist die A3C-spezifische Deaminaseaktivität durch diese R122A-Mutation nicht beeinträchtigt (Stauch *et al.*, 2009). Daraus läßt sich schlußfolgern, dass eine RNA-A3C-Interaktion sowohl für die Hemmung der SIV_{agm}Δ*vif*-Replikation als auch für die Inhibition der L1-Retrotransposition durch A3C essentiell ist. Es konnte gezeigt werden, dass A3C sowohl an 7SL-RNA als auch an 5,8S-RNA binden kann (Stauch *et al.*, 2009).

Auch für andere APOBEC-Proteine wurde bereits eine Interaktion mit spezifischen RNAs nachgewiesen. Chiu *et al.* (2006) zeigten, dass A3G neben *Alu*-RNAs auch hY-RNAs binden kann. Wang *et al.* (2007, 2008b) demonstrierten die RNA-abhängige Inhibition von HIVΔ*vif* durch A3G. Dabei bindet A3G an 7SL-RNA und kann erst dann mit der Nukleokapsiddomäne von HIV-Gag interagieren. Dadurch ist das Verpacken von A3G in HIV-Partikel und daraus resultierend die Inhibition von HIVΔ*vif* möglich. Die gleiche 7SL-RNA-abhängige

Inkorporation in Vif-defiziente HIV-Partikel wurde auch für A3F nachgewiesen (Wang *et al.*, 2008a). Es wurde gezeigt, dass APOBEC-Proteine eine Inhibition der HIV Δ vif-Replikation über unterschiedliche Mechanismen erreichen (Wang *et al.*, 2008b). So konnte auch für A3C eine RNA-abhängige Interaktion mit der Matrixdomäne von HIV-Gag nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2008b). Außerdem wurde eine RNA-abhängige Interaktion zwischen A3G und dem Nukleokapsidprotein des menschlichen Coronavirus 229E (HCoV-229E; Wang und Wang, 2009) sowie der reversen Transkriptase von HBV (Nguyen und Hu, 2008) gezeigt. Die Beobachtung, dass eine Interaktion zwischen AID und DNA irrelevant für die Hemmung der L1-Retrotransposition durch AID ist (Macduff *et al.*, 2009), wäre konsistent mit einer möglichen RNA-abhängigen Hemmung durch AID.

Unsere Beobachtung, wonach bereits geringe Mengen der RNA-Bindetaschenmutante A3C-R122A ausreichen, um eine Steigerung der L1-Retrotranspositionsrate um 63 % zu erreichen, könnte auf einen dominant-negativen Effekt dieser Mutante zurückzuführen sein. Man könnte sich vorstellen, dass bereits der Einbau eines einzelnen A3C-R122A-Monomers als Teil eines A3C-Dimers oder -Tetramers zu deren Inaktivierung führt (Abb. 38). Dies würde erklären, auf welche Weise vergleichsweise geringe Mengen an R122A-Mutantenprotein den ursprünglichen L1-inhibierenden Effekt von endogen exprimiertem A3C (Muckenfuß *et al.*, 2006) aufheben konnten (Abb. 26 und 27). Die beobachtete 63 %-ige Steigerung der L1-Retrotranspositionsrate relativ zur Positivkontrolle könnte so erklärt werden. Interessanterweise beobachtete man bei einer Unterdrückung der endogenen A3C-Expression mittels siRNA eine ähnliche Steigerung der L1-Retrotranspositionsrate in Hela-Zellen (Muckenfuß *et al.*, 2006) um 78 %, wie im Falle der Expression der A3C-R122A-Mutante.

Ein ähnlicher dominant-negativer Effekt, der zu einer Steigerung der L1-Retrotranspositionsrate um 40 - 70 % führte, wurde für zwei A3A-Deaminasedomänenmutanten (A3A-E72A und A3A-C101A/C106A) veröffentlicht (Muckenfuß *et al.*, 2006). Der Effekt konnte in dieser Arbeit (Abb. 25) nur für die A3A-C101A/C106A-Mutante reproduziert werden, für die eine Hemmung der L1-Aktivität um 66 % beobachtet wurde. Die Mutante A3A-E72A zeigte in unserem L1-Retrotranspositionsreporterassay keinerlei Effekt auf die L1-Aktivität. Im Gegensatz dazu verzeichnete eine andere Arbeitsgruppe in Gegenwart der A3A-E72A-Mutante einen Anstieg der L1-Retrotranspositionsrate um 20 - 40 % (Macduff *et al.*, 2009), wohingegen die A3A-E72Q-Mutante zu einer Hemmung der L1-Aktivität um ca. 30 % führte (Chen *et al.*, 2006). Die gegensätzlichen Effekte der Mutanten E72A und E72Q auf die L1-Aktivität ließen sich durch die unterschiedliche Molekülgröße von Alanin (A) und Glutamin (Q) erklären, die zu unterschiedlichen räumlichen Strukturen und damit zu gegensätzlichen Effekten beider Mutanten führen könnten. Die Diskrepanzen in den beobachteten Effekten der A3A-E72A-

Mutante auf die L1-Aktivität zwischen unseren Ergebnissen einerseits und den von Muckenfuß *et al.* (2006) und Macduff *et al.* (2009) andererseits könnten auf Unterschiede in der experimentellen Durchführung zurückzuführen sein.

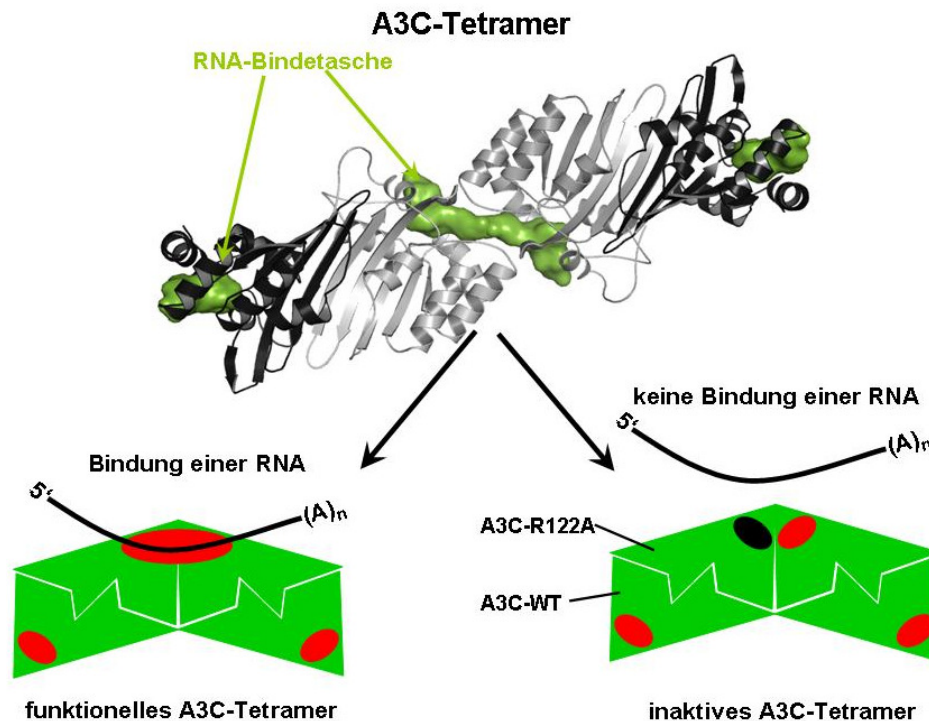


Abbildung 38: Arbeitshypothese zum dominante-negativen Effekt der A3C-R122A-Mutante auf die Hemmung der L1-Retrotransposition durch A3C-WT. *In silico*-Analysen sprechen für die Ausbildung funktioneller A3C-Tetramere (Abbildung zur Verfügung gestellt von H. Hofmann, Arbeitsgruppe Prof. Münk). Dabei vereinen sich die RNA-Bindetaschen der beiden inneren Monomere zu einer gemeinsamen großen RNA-Bindetasche. Wird eines der inneren A3C-WT-Monomere gegen ein R122A-Mutantenmonomer ausgetauscht, könnte vielleicht diese gemeinsame RNA-Bindetasche nicht mehr ausgebildet werden. Als Konsequenz kann das gesamte A3C-Tetramer nicht mehr an eine RNA binden und wäre folglich inaktiv.

Für APOBEC1 wurde bereits beschrieben, dass eine katalytisch inaktive Mutante das entsprechende Wildtypprotein inaktivieren kann (Oka *et al.*, 1997). Dabei wurde gezeigt, dass die katalytisch inaktive Mutante A1-H61K/C93S/C96S Heterodimere mit A1-WT bilden kann. Diese Heterodimere waren nicht mehr in der Lage, die *apoB*-mRNA zu editieren. Unsere Beobachtung, wonach bei der Titration des dominant-negativen Effekts von A3C-R122A nach anfänglicher Zunahme bei Erreichen eines Schwellenwertes eine Abnahme der L1-Retrotranspositionsrate zu verzeichnen war (Abb. 27), könnte darauf zurückzuführen sein, dass die A3C-Mutantenproteine bei Erreichen einer bestimmten Konzentration unlösliche Aggregate bilden. Endogenes A3C könnte dann wieder funktionelle Oligomere bilden, die die L1-Retrotransposition wieder stärker hemmen können (Abb. 27).

Aufgrund der Abhängigkeit der A3C-bedingten L1-Inhibition von der Bindung an eine RNA kommen einige deaminaseunabhängige Mechanismen der L1-Inhibition in Frage: **1.** A3C sequestriert die L1-RNA in ein zelluläres Kompartiment und verhindert damit die Bildung

funktioneller L1-RNPs. Ein solcher Vorgang wurde bereits für die Inhibierung der *Alu*-Retrotransposition durch A3G vorgeschlagen (Chiu *et al.*, 2006). **2.** Vollständige L1-RNPs werden über die L1-RNA/A3C-Interaktion sequestriert. **3.** Durch die L1-RNP/A3C-Interaktion wird der Import der L1-RNPs in den Zellkern verhindert. **4.** A3C wird in L1-RNPs inkorporiert und hemmt den TPRT-Prozess. Ein ähnlicher Vorgang wurde für die Hemmung von HIVΔvif durch A3G diskutiert, wobei A3G die Initiation der proviralen Integration blockieren soll (Luo *et al.*, 2007).

Die Anwesenheit von APOBEC3C verringert die Anzahl von L1-Neuinsertionen

Der inhibierende Effekt der APOBEC-Proteine auf die L1-Retrotransposition wurde mittels Retrotranspositionsreporterassays quantifiziert. Die L1-Reporterplasmide verfügten dabei entweder über eine Neomycin-Phosphotransferase-Expressionskassette (Muckenfuß *et al.*, 2006; OhAinle *et al.*, 2008) oder eine GFP-Expressionskassette (Stenglein und Harris, 2006; Macduff *et al.*, 2009). Eine *de novo* L1-Insertion muss demnach mindestens das vollständige Reportergen enthalten, um der Zelle die Expression der Neomycin-Phosphotransferase bzw. des GFPs zu ermöglichen. Allerdings ist die große Mehrheit der genomischen (85 %; Szak *et al.*, 2002) und *de novo* L1-Insertionen (93 %; Gilbert *et al.*, 2002; Symer *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2005) 5'-verkürzt, wodurch es im Falle der *de novo* L1-Insertionen möglich ist, dass die L1-Kopie gar kein oder nur Teile des Reportergens besitzt. Ein solches L1-Element würde der Zelle keine Resistenz gegenüber der Selektion mit Geneticin vermitteln bzw. keine Expression eines funktionellen GFP erlauben. Das Reportergen setzt also eine Detektionsgrenze für *de novo* L1-Insertionen. Es wäre daher möglich, dass sich entsprechend unserer Arbeitshypothese (Abb. 18) die Anzahl an L1-Retrotranspositionseignissen selbst nicht ändert, jedoch die Längen dieser L1-Neuinsertionen so stark verkürzt werden, dass keine intakten Reportergene mehr eingeschlossen sind und diese Neuinsertionen somit nicht mehr nachgewiesen werden können. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden L1-Neuinsertionen, die in An- bzw. Abwesenheit von A3C stattgefunden haben, mittels der Methode der inversen PCR (S. 36; An *et al.*, 2006) quantifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass damit auch solche L1-Neuinsertionen detektiert werden können, die so stark verkürzt sind, dass sie kein vollständiges Reportergen mehr tragen (Abb. 30).

Obwohl die IPCR-Analysen an genomischer DNA von Mischpopulationen durchgeführt wurden, die aus einer vergleichbaren Anzahl von Einzelkolonien (798 bzw. 846) hergestellt wurden, konnten weniger *de novo* Insertionen aus derjenigen Population amplifiziert werden, deren Retrotransposition in Anwesenheit von A3C stattfand. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei Anwesenheit von A3C vermehrt stark verkürzte L1-

Integrationen entstehen, die selbst durch IPCR nicht mehr nachgewiesen werden können. Alternativ wäre es möglich, dass bei Abwesenheit von überexprimiertem A3C häufiger mehrere L1-Retrotranspositionereignisse pro Zelle auftreten und somit mehr Ereignisse durch IPCR nachgewiesen werden. Wenn letzteres zutrifft, würde das unsere bisherigen Daten zu A3C unterstützen, welche besagen, dass A3C die L1-Aktivität nicht über den in unserer Arbeitshypothese (Abb. 18) postulierten Mechanismus der Deaminierung von Cytosinen hemmt, sondern die *de novo* L1-Retrotransposition tatsächlich über einen alternativen Mechanismus inhibiert. Beispiele für eine Deaminase-unabhängige Hemmung, die zu einer Verringerung der Anzahl integrierter Retroelemente führt, sind auf Seite 96 aufgeführt. Warum aus mindestens 800 einzelnen *de novo* L1-Insertionsereignissen, die zu Mischpopulationen vereint wurden, nur acht bzw. 13 Insertionen tatsächlich amplifiziert werden konnten, ist unbekannt. Es wäre aber möglich, dass in der siebentägigen Inkubationszeit, der die HeLa-Zellen zwischen dem Erstellen der Mischpopulationen und der Isolierung der genomischen DNA unterzogen wurden, nur wenige L1-Insertionsereignisse einen positiven Effekt auf das Wachstum der Wirtszelle ausgeübt, wodurch diese Zellen den Großteil der Zellen mit anderen L1-Insertionen aus der Mischpopulation verdrängt haben.

4.3 Hinweise für eine Interaktion zwischen APOBEC3C und LINE-1-RNPs

Nach der Auftrennung von Zelllysaten über einen Saccharosegradienten befinden sich APOBEC3C und L1-ORF1p in der selben Fraktion

L1-RNA und die von ihr kodierten Proteine bilden im Zytoplasma Ribonukleoproteinkomplexe (Kulpa und Moran, 2006). Diese L1-RNPs gelangen anschließend über einen bisher unbekannten Mechanismus zur genomischen DNA im Zellkern, wo sich über den TPRT-Mechanismus die reverse Transkription und Integration neuer L1-Kopien anschließt. Es ist unklar, ob andere von der Wirtszelle kodierte RNAs oder Proteine Bestandteile der L1-RNPs sind. Es ist jedoch bekannt, dass sowohl A3C als auch A3F und A3G in HIVΔ*vif*-Partikel verpackt werden (Mariani *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2008b). A3G ist auch in verschiedenen zellulären Komplexen bzw. Kompartimenten nachgewiesen worden (Wichroski *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007). Um zu prüfen, ob A3C und L1-RNPs in einem gemeinsamen Komplex vorliegen, wurden HeLa-Zelllysate in einem Saccharosegradienten aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen auf die Anwesenheit von A3C und L1-ORF1p untersucht. Die Immunoblotanalyse der Präzipitate aus den Zentrifugationsüberständen sowie deren Analyse mittels Immunoblot erbrachte den Nachweis der Kolo-kalisation von L1-ORF1p und A3C in Fraktion 9 (Abb. 31). Während die

Abwesenheit von A3C in den Zentrifugationspellets gegen eine A3C/L1-RNP-Interaktion spricht, kommen als mögliche alternative Gründe für die Abwesenheit von A3C in den Pellets das Einfrieren der Fraktionen vor dem Zentrifugieren, falsche Zentrifugationsbedingungen an sich sowie das ungenügende Verdünnen der Saccharosefraktionen vor dem Zentrifugieren in Frage.

Die Kolokalisation von A3C und L1-ORF1p in einer Saccharosefraktion mit einer Konzentration von ca. 20 % spricht dafür, dass beide Proteine Bestandteile von sogenannten „**Low Molecular Mass Complexes**“ (LMMC) sind. Diese Einteilung der APOBEC3-Protein-enthaltenden Komplexe in LMMC und HMMC („**High Molecular Mass Complexes**“) wurde zuerst von Chiu *et al.* (2005) beschrieben. Die Autoren zeigten, dass A3G in CD4-positiven T-Zellen in HMMCs zu finden sind, die ein Molekulargewicht von über 700 kDa haben. Eine Behandlung mit RNase veränderte die Lokalisation von A3G in LMMCs. Später gelang der Nachweis, dass A3G in den LMMCs enzymatisch aktiv ist. A3G in den HMMCs dagegen ist weitestgehend enzymatisch inaktiv (Chiu *et al.*, 2006). Soros *et al.* (2007) gelang der Nachweis, dass nur neu synthetisiertes A3G aus den LMMCs in Vif-defiziente HIV-Partikel inkorporiert wird. Dass auch andere APOBEC3-Proteine in HMMCs vorliegen, wiesen Tan *et al.* (2008) für A3F und A3H in 293T-Zellen nach. Wang *et al.* (2008b) zeigten für 293T-Zellen, dass A3C ebenfalls in HMMCs vorkommt (18 - 30 % Saccharose). Nach einer Behandlung mit RNase zeigte sich A3C auch hier in LMMCs (10 - 18 % Saccharose), was dafür spricht, dass L1-ORF1p und A3C in den potentiell aktiven LMMCs interagieren. Da sich A3A und A3C durch beinahe identische Primärstrukturen auszeichnen (Jarmuz *et al.*, 2002), besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass beide APOBEC3-Proteine ähnliche Interaktionen eingehen. Daher ist der Nachweis von A3A in LMMCs (10 - 16 % Saccharose; Niewiadomska *et al.*, 2007) konsistent mit der Lokalisierung von A3C in LMMCs (Wang *et al.*, 2008b). Weiterhin ist die Identifizierung von L1-RNA/A3A-Kopräzipitaten in den Fraktionen mit 19 - 23 % Saccharose (Niewiadomska *et al.*, 2007) konsistent mit unserer Beobachtung, wonach sich sowohl A3C als auch L1-ORF1p in der 20 %-Saccharosefraktion befinden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass A3G, welches die *Alu*-Retrotransposition hemmt und mit HMMCs assoziiert ist, mit *Alu*-RNA kopräzipitiert (Chiu *et al.*, 2006). Daraus wurde geschlossen, dass A3G die *Alu*-Retrotransposition hemmt, indem es die *Alu*-RNA in HMMCs sequestriert. Unsere bisherigen Ergebnisse lieferten jedoch ausschließlich Hinweise auf eine Kolokalisation von L1-ORF1p und A3C in LMMCs, während eine Kolokalisation beider Proteine in HMMCs bisher nicht demonstriert werden konnte.

Die Anwesenheit von überexprimiertem APOBEC3C hat keinen Einfluß auf die zytoplasmatische Lokalisation von L1-ORF1p in HeLa-Zellen

Um die Frage nach einer möglichen Sequestrierung der L1-RNPs durch A3C zu beantworten, wurde die subzelluläre Lokalisation von A3C und L1-ORF1p mittels Immunofluoreszenzanalysen untersucht. L1-ORF1p war sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit von überexprimiertem A3C ausschließlich im Zytoplasma von HeLa- und 143B-Zellen nachweisbar (Abb. 32).

Wir konnten beobachten, dass A3C in 143B-Zellen gleichmäßig in Zellkern und Zytoplasma verteilt war. Eine ähnliche A3C-Verteilung in der ganzen Zelle wurde auch für HeLa-Zellen von Muckenfuß *et al.* (2006) und Kinomoto *et al.* (2007) beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigte Abb. 32A eine auf das Zytoplasma beschränkte Lokalisation von A3C in HeLa-Zellen. Ähnliche Unterschiede zeigten sich auch in der Lokalisation von L1-ORF1p. Die großräumige Verteilung von L1-ORF1p im Zytoplasma von 143B-Zellen stimmt mit dem L1-ORF1p-Verteilungsmuster überein, das Goodier *et al.* (2004) für 143B-Zellen zeigten. Die ähnlich großräumige L1-ORF1p-Verteilung in HeLa-Zellen unterscheidet sich von der punktuellen L1-ORF1p-Verteilung in HeLa-Zellen, die Goodier *et al.* (2004) bei der alleinigen Überexpression von L1-ORF1p dokumentierten. Dieser Unterschiede in der A3C- und L1-ORF1p-Lokalisation ließen sich dadurch erklären, dass die für diese Immunofluoreszenzanalysen verwendeten HeLa-Zellen zu einem anderen Subklon gehören und aus einer späteren Passage stammen, wodurch diese HeLa-Zellen im Vergleich mit den von Muckenfuß *et al.* (2006), Kinomoto *et al.* (2007) und Goodier *et al.* (2004) verwendeten Zellen auch leicht veränderte Eigenschaften aufwiesen.

Dass L1-ORF1p, wenn man es nur im Kontext eines vollständigen L1-Elements alleine exprimiert oder zusammen mit A3C koexprimiert, stets nur im Zytoplasma von HeLa- und 143B-Zellen nachgewiesen wurde (Abb. 32A), könnte darauf hindeuten, dass A3C die L1-Retrotransposition nicht durch eine Sequestrierung der L1-RNPs hemmt. Allerdings wäre es auch möglich, dass in Abwesenheit von überexprimiertem A3C nur wenige L1-RNPs in den Zellkern gelangen, so dass deren Signale aufgrund der leichten unspezifischen Hintergrundfärbung sämtlicher Zellkerne durch den α -T7-„tag“-Antikörper nicht detektiert werden konnten.

Eine weitere Auffälligkeit war, dass A3C und L1-ORF1p in 143B-Zellen aber nicht in HeLa-Zellen auch in bestimmten zytoplasmatischen Regionen angereichert waren. Eine ähnliche gleichmäßige Verteilung in der gesamten Zelle mit punktueller Anreicherung im Zytoplasma zeigten Muckenfuß *et al.* (2006) für A3G in HeLa-Zellen. Berücksichtigt man, dass A3B, A3F und A3G bereits in „P-bodies“ nachgewiesen wurden (Chiu *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2006; Wichroski *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007) und dass A3B, A3F und A3G in 143B-

Zellen endogen exprimiert werden (Kinomoto *et al.*, 2007), während in HeLa-Zellen nur A3F und in geringem Maße auch A3B endogen nachgewiesen wurden (Muckenfuß *et al.*, 2006 Kinomoto *et al.*, 2007), wäre es möglich, dass die lokale Anreicherung von A3C und L1-ORF1p in 143B-Zellen auf die Lokalisation in „*P-bodies*“ zurückzuführen ist.

Die gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung zusammen mit L1-ORF1p wurde nicht nur für A3C-WT und die Deaminasedomänenmutante C97S/C100S beobachtet, die einen L1-inhibierenden Effekt besitzen (S. 63), sondern auch für die beiden Dimerisierungsmutanten F55A und W74A sowie die RNA-Bindetaschenmutante R122A, die alle drei die L1-Aktivität nicht hemmen (S. 69 und S. 65; Abb. 32B). Da auch A3C-Proteine ohne L1-hemmenden Effekt zusammen mit L1-ORF1p im Zytoplasma gleichmäßig verteilt waren, wäre es möglich, dass diese beobachtete Verteilung ein Artefakt ist, das auf den großen Mengen an A3C- und L1-ORF1-Proteinen beruht, die in den HeLa-Zellen überexprimiert wurden.

Auffällig war weiterhin, dass die C97S/C100S-Mutantenproteine genauso wie A3C-WT-Proteine fast ausschließlich im Zytoplasma von HeLa-Zellen lokalisiert waren, während die F55A-, W74A- und R122A-Mutantenproteine, die keine funktionellen A3C-Dimere bilden können bzw. keine RNAs binden können (Stauch *et al.*, 2009), gleichmäßig in Zytoplasma und Zellkern verteilt waren. Das deutet darauf hin, dass funktionelle A3C-Dimere an eine RNA binden und dadurch im Zytoplasma verbleiben. Das wiederum unterstützt die Hypothese, dass A3C an die L1-RNA bindet und diese möglicherweise im Zytoplasma von den L1-kodierten Proteinen sequestriert, wodurch die L1-Retrotransposition inhibiert wird.

Die experimentellen Daten sprechen gegen eine Interaktion zwischen APOBEC3C und L1-ORF1p

Es sollte geprüft werden, ob A3A oder A3C direkt mit L1-ORF1p in den L1-RNPs interagiert oder ob diese Interaktion über eine RNA-Wechselwirkung vermittelt wird. Unsere Ergebnisse (Abb. 33 und 34) sprechen dafür, dass weder A3A noch A3C direkt oder indirekt über eine RNA mit L1-ORF1p interagieren. Diese fehlende direkte Interaktion zwischen A3A und L1-ORF1p wurde kürzlich von Lovsin und Peterlin (2009) mittels Koimmunopräzipitationsanalysen bestätigt.

Allerdings schließen die Ergebnisse eine Interaktion von A3A bzw. A3C mit anderen Komponenten der L1-RNPs nicht aus. Mit Ausnahme der direkten Protein/Protein-Interaktion zwischen A3G und HIV-kodiertem Vif-Protein sind sämtliche bisher nachgewiesenen Interaktionen mit A3-Proteinen, die alle eine inhibitorische Wirkung hatten, über eine RNA- bzw. cDNA-Interaktion (im Falle von A3-vermittelter Deaminierung) vermittelt. Vif bindet an A3G und leitet dadurch den Abbau von A3G im Proteasom ein (Marin *et al.*, 2003). Durch die Expression von Vif verteidigt sich HIV gegen den Einbau von A3G in das HIV-Partikel und

entgeht so der antiviralen Wirkung von A3G. Diese Vif-abhängige Umgehung der angeborenen zellulären Immunabwehr wurde auch für A3C (HIV-1, SIV_{mac}, SIV_{agm}), A3DE (HIV-1, SIV_{mac}) und A3F (HIV-1, SIV_{mac}) beschrieben (Chiu und Greene, 2008). Alle anderen bisher bekannten Interaktionen eines APOBEC3-Proteins mit anderen Proteinen werden durch eine RNA vermittelt. Von besonderem Interesse sind dabei die RNA-vermittelten Wechselwirkungen mit viralen Proteinen (S. 98). Durch die Interaktion von APOBEC3-Proteinen mit viralen RNAs wird deren Verpackung in Viruspartikel ermöglicht und so ihre räumliche Nähe zu viralen Nukleinsäuren garantiert. Die für diese Interaktionen essentiellen RNAs müssen dabei nicht auf dem retroviralen Genom selbst kodiert sein (Wang *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2008b). Da das in L1-RNPs eingeschlossene L1-ORF2p ebenso wie L1-ORF1p essentiell ist für die L1-Retrotransposition, ist es vorstellbar, dass eine RNA-vermittelte Interaktion zwischen A3C und L1-ORF2p entscheidend für die A3C-vermittelte Hemmung der L1-Retrotransposition ist.

Es konnte auch gezeigt werden, dass APOBEC3-Proteine mit einer Reihe wirtskodierter Proteine in verschiedenen zellulären Kompartimenten assoziiert sein können (Chiu *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2006; Wichroski *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007). A3B, A3F und A3G wurden in den sogenannten „*P-bodies*“ nachgewiesen, während A3F und A3G in „*stress granules*“ und in Polysomen gefunden wurden. Die Interaktionen wurden über RNA-Wechselwirkungen vermittelt. Zu den identifizierten Proteinen gehörten mRNA-bindende Proteine, ribosomale Proteine, RNA-Helikasen sowie Proteine, die an der posttranslationalen Regulierung sowie anderen Mechanismen der RNA-Regulation beteiligt sind (Chiu *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2006; Wichroski *et al.*, 2006; Gallois-Montbrun *et al.*, 2007). Die Rolle der APOBEC3-Proteine in diesen Komplexen ist unklar. Chiu *et al.* (2006) schlugen vor, dass diese Komplexe der Ort sind, zu dem A3G die *Alu*-RNA von den L1-kodierten Proteinen sequestriert. Somit wäre es auch vorstellbar, dass A3C direkt an die L1-RNA bindet und so beispielsweise den Import der L1-RNPs in den Zellkern verhindert. Diese Hypothese wäre in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, wonach A3C die L1-Aktivität deaminaseunabhängig inhibiert, hierfür aber eine intakte RNA-Bindetasche benötigt. Unsere Daten sprechen dafür, dass A3C dabei mit den L1-RNPs assoziiert ist, aber nicht mit L1-ORF1p interagiert.

Die Expression von L1-ORF2p mittels MVA/T7RP-System in HeLa-Zellen war nicht erfolgreich

Da eine direkte Interaktion zwischen L1-ORF1p und A3C nicht nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.5.3), sollte überprüft werden, ob A3C direkt oder über eine RNA an L1-ORF2p bindet. Die Immunoblotanalyse der Zelllysate ergab, dass die HeLa-Zellen erfolgreich mit

MVA/T7RP infiziert wurden (Abb. 35). Leider konnte die Expression von L1-ORF2p nicht nachgewiesen werden. Grundlegende Fehler im Ablauf der Infektion und Transfektion der Zellen können als Ursache ausgeschlossen werden, denn die Expression von L1-ORF1p mittels des MVA/T7RP-Systems war erfolgreich (Abb. 33). Dass das Plasmid pMINI-FLAG-ORF2 prinzipiell die Expression von L1-ORF2p gestattet, wiesen Goodier *et al.* (2004) in 143B-Zellen nach. Somit bleiben als mögliche Gründe für die fehlgeschlagene Expression von L1-ORF2p zum einen der zytotoxische Effekt der Endonukleasedomäne von L1-ORF2p (Feng *et al.*, 1996; Zingler *et al.*, 2005), der zum vorzeitigen Absterben der HeLa-Zellen geführt haben könnte, und zum anderen die HeLa-Zellen, die möglicherweise sensitiver auf die Expression von L1-ORF2p reagieren als die 143B-Zellen. Außerdem ist es möglich, dass der Zeitpunkt, an dem die Zelllysate hergestellt wurden, bereits zu spät gewählt wurde, da diejenigen Zellen, die tatsächlich L1-ORF2p exprimierten, zu diesem Zeitpunkt bereits abgestorben waren.

4.4 AID, APOBEC1 und APOBEC2 haben keinen hemmenden Effekt auf die L1-Retrotranspositionsrate

Da sich die menschlichen APOBEC1- und APOBEC3-Proteine wahrscheinlich evolutionär von der AID bzw. APOBEC2 ableiten (Conticello *et al.*, 2005), wurde überprüft, ob auch die menschlichen AID-, APOBEC1- und APOBEC2-Proteine in der Lage sind, die L1-Aktivität zu inhibieren. Keines der drei Proteine zeigte in Retrotranspositionsreporterassays einen hemmenden Einfluß auf die L1-Retrotranspositionsrate (Abb. 36). Unsere Ergebnisse zum Effekt von AID auf die L1-Retrotranspositionsrate stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Macduff *et al.* (2009), die zeigten, dass die menschliche AID die L1-Retrotransposition um bis zu 80 % reduzieren kann. Außerdem bestätigte der Nachweis, dass die AID-Proteine aus Maus, Ratte, Schwein, Zebrafisch und Kugelfisch ebenfalls die Aktivität des menschlichen L1-Elements um bis zu 85 % reduzieren können, das hohe evolutionäre Alter der Interaktion zwischen L1-Retrotransposons und Mitgliedern der APOBEC-Proteinfamilie. Eine mögliche Erklärung dafür, dass in den von uns durchgeführten Experimenten der L1-inhibierende Effekt von AID nicht bestätigt werden konnte, könnte sein, dass das von uns eingesetzte AID-Protein mit einem V5-Epitop markiert war, während das in den Publikationen beschriebene L1-inhibierende AID-Protein mit einem HA-Epitop markiert war. Es wäre möglich, dass durch die Markierung des C-terminalen AID-Endes mit dem V5-Epitop sowie mit sechs Histidinen die dreidimensionale Struktur des Proteins verändert wurde, wodurch AID die L1-Aktivität nicht mehr hemmen kann.

Ob das menschliche APOBEC1 die L1-Retrotranspositionsrate hemmen kann, wurde bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe untersucht. Allerdings wird unsere Beobachtung, wonach humanes APOBEC1 keinerlei Auswirkungen auf die humane L1-Aktivität hat (Abb. 36), unterstützt durch einen Bericht, wonach humanes APOBEC1 keinerlei Effekt auf die HIV Δ vif-Replikation hat (Bishop *et al.*, 2004). In derselben Publikation wurde jedoch auch demonstriert, dass APOBEC1 aus der Ratte die HIV Δ vif-Replikation sehr wohl inhibieren kann. Ikeda *et al.* (2008) wiesen nach, dass die APOBEC1-Proteine aus Kaninchen und Hamster zu einer 10 - 1.000-fachen Senkung der infektiösen Titer von HIV Δ vif, SIV_{agm} Δ vif und SIV_{mac} Δ vif führen können, während die APOBEC1-Proteine aus Mensch und Frettchen dazu nicht in der Lage sind. Außerdem wurde berichtet, dass das murine APOBEC1, aber nicht das menschliche APOBEC1, die RNA von MLV mutieren kann (Petit *et al.*, 2008).

Die Funktion des menschlichen APOBEC2-Proteins ist bis heute unklar (Chiu und Green, 2008) und es gibt bisher keine Daten, die unsere Ergebnisse zum fehlenden Effekt von APOBEC2 auf die L1-Retrotransposition bestätigen oder widerlegen. Es wurde bisher lediglich gezeigt, dass das murine APOBEC2 im Gegensatz zum murinen APOBEC1- und APOBEC3-Protein keinerlei APOBEC-spezifischen G-zu-A-Hypermutationen innerhalb der MLV-cDNA erzeugt (Petit *et al.*, 2008).

5 Zusammenfassung

LINE-1-Retrotransposons sind für die Entstehung von über 35 % des menschlichen Genoms verantwortlich. Während ihre Aktivität entscheidend zur Evolution von Säugetieren allgemein und des Menschen im Speziellen beigetragen hat, kann die L1-Expression und die L1-vermittelte Retrotransposition schädigende Auswirkungen für die Wirtszelle haben (Goodier und Kazazian, 2008). Die Liste der dokumentierten, durch L1-Aktivität hervorgerufenen Erkrankungen umfaßt gegenwärtig ca. 65 Fälle von genetischen bzw. Tumorerkrankungen und wird immer länger. Um die Anzahl schädigender L1-Retrotranspositionereignisse zu minimieren, hat der menschliche Organismus Strategien entwickelt, um die L1-Retrotransposition zu kontrollieren. Eine dieser Strategien ist die Inhibition der L1-Aktivität durch Mitglieder der APOBEC-Proteinfamilie, wobei deren jeweilige Mechanismen der L1-Inhibition gegenwärtig noch nicht aufgeklärt sind. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, Einblicke in die Mechanismen der Hemmung der L1-Retrotransposition durch Mitglieder der Familie der humanen APOBEC3-Proteine zu bekommen, wobei eine Fokussierung auf den durch APOBEC3C vermittelten Mechanismus vorgenommen wurde.

Aufbauend auf kürzlich publizierte Daten zur Hemmung der L1-Retrotransposition durch die APOBEC3-Proteine A3A, A3B, A3C und A3F (Bogerd *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Muckenfuß *et al.*, 2006) wurde eine Arbeitshypothese entwickelt, welche die L1-Inhibition durch APOBEC3-vermittelte Deaminierung von Cytosinen der L1-cDNA unter der Beteiligung von Faktoren des „Base Excision Repair“-Weges erklärt. Diese Arbeitshypothese steht im Einklang mit der Abwesenheit nachweisbarer G-zu-A-Hypermutationen von L1-Kopien wie sie für die APOBEC3-spezifische Deaminaseaktivität charakteristisch sind, sowie mit der Existenz 5'-verkürzter genomischer L1-Kopien. Die Ergebnisse aus *in silico*-Analysen der 5'-Enden von 38 L1-Neuinsertionen aus Zellkulturexperimenten, die in Anwesenheit von endogen exprimiertem A3B, A3C und A3H retrotransponiert waren, sowie von 885 genomischen, endogenen L1-Kopien waren in Übereinstimmung mit unserer Arbeitshypothese, da in beiden Fällen Guanin als erste fehlende L1-Nukleobase am L1-5'-Ende statistisch signifikant überrepräsentiert vorliegt.

Während für die Inhibition von L1 durch A3A dessen Deaminaseaktivität notwendig ist, wurde gezeigt, dass A3C die L1-Retrotransposition über einen deaminaseunabhängigen Mechanismus hemmt. Die L1-Inhibition durch A3C erforderte sowohl eine funktionelle Dimerisierungsdomäne als auch eine intakte RNA-Bindedomäne. Die Identifizierung von A3C und L1-ORF1p in derselben Saccharosegradientenfraction sowie die Koloalisation beider Proteine im Zytoplasma von HeLa- bzw. 143B-Zellen sprechen für eine Interaktion von A3C mit L1-ORF1p bzw. L1-RNPs. Da eine direkte Interaktion von A3C und L1-ORF1p mittels Immunopräzipitation nicht nachgewiesen werden konnte, spricht dies dafür, dass die

Interaktion nicht auf einen direkten Kontakt zwischen A3C und L1-ORF1p beruht. Eine direkte Interaktion zwischen A3A und L1-ORF1p konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Vielmehr spricht die Abhängigkeit der A3C-vermittelten Hemmung von der intakten RNA-Bindedomäne, experimentelle Daten, welche eine Interaktion mit L1-RNPs vorschlagen, sowie die Kollokalisierung von A3C und L1-ORF1p im Zytoplasma für eine Sequestrierung der L1-RNPs, die Behinderung des nukleären Imports der L1-RNPs oder aber eine Blockierung der TPRT-Initiation als mögliche Mechanismen der A3C-vermittelten Hemmung der L1-Retrotransposition.

Literaturverzeichnis

- Abu, M. and Waters, T. R. 2003 The main role of human thymine-DNA glycosylase is removal of thymine produced by deamination of 5-methylcytosine and not removal of ethenocytosine. *J Biol Chem* 278, 8739-8744.
- Alce, T. M. and Popik, W. 2004 APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 279, 34083-34086.
- Alisch, R. S., Garcia-Perez, J. L., Muotri, A. R., Gage, F. H., and Moran, J. V. 2006 Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes Dev* 20, 210-224.
- Allen, E., Horvath, S., Tong, F., Kraft, P., Spiteri, E., Riggs, A. D., and Marahrens, Y. 2003 High concentrations of long interspersed nuclear element sequence distinguish monoallelically expressed genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9940-9945.
- An, W., Han, J. S., Wheelan, S. J., Davis, E. S., Coombes, C. E., Ye, P., Triplett, C., and Boeke, J. D. 2006 Active retrotransposition by a synthetic L1 element in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18662-18667.
- Arcot, S. S., Wang, Z., Weber, J. L., Deininger, P. L., and Batzer, M. A. 1995 Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics* 29, 136-144.
- Athanikar, J. N., Badge, R. M., and Moran, J. V. 2004 A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Res* 32, 3846-3855.
- Babushok, D. V. and Kazazian, H. H., Jr. 2007 Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat* 28, 527-539.
- Bailey, J. A. and Eichler, E. E. 2006 Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nat Rev Genet* 7, 552-564.
- Barnes, D. E. and Lindahl, T. 2004 Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38, 445-476.
- Beauregard, A., Curcio, M. J., and Belfort, M. 2008 The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *Annu Rev Genet* 42, 587-617.
- Becker, K. G., Swergold, G. D., Ozato, K., and Thayer, R. E. 1993 Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element. *Hum Mol Genet* 2, 1697-1702.
- Belancio, V. P., Hedges, D. J., and Deininger, P. 2008 Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res* 18, 343-358.
- Bibillo, A. and Eickbush, T. H. 2004 End-to-end template jumping by the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon. *J Biol Chem* 279, 14945-14953.
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., Davidson, N. O., Cho, S. J., and Malim, M. H. 2004 Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 14, 1392-1396.

- Bishop, K. N., Holmes, R. K., and Malim, M. H. 2006 Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol* 80, 8450-8458.
- Bishop, K. N., Verma, M., Kim, E. Y., Wolinsky, S. M., and Malim, M. H. 2008 APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 4, e1000231.
- Boeke, J. D. 1997 LINEs and Alus--the polyA connection. *Nat Genet* 16, 6-7.
- Boeke, J. D. and Pickeral, O. K. 1999 Retroshuffling the genomic deck. *Nature* 398, 108-9, 111.
- Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Lueders, K. K., and Cullen, B. R. 2006 APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* 34, 89-95.
- Boorstein, R. J., Cummings, A., Jr., Marenstein, D. R., Chan, M. K., Ma, Y., Neubert, T. A., Brown, S. M., and Teebor, G. W. 2001 Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *J Biol Chem* 276, 41991-41997.
- Bratthauer, G. L. and Fanning, T. G. 1992 Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Oncogene* 7, 507-510.
- Bratthauer, G. L. and Fanning, T. G. 1993 LINE-1 retrotransposon expression in pediatric germ cell tumors. *Cancer* 71, 2383-2386.
- Bratthauer, G. L., Cardiff, R. D., and Fanning, T. G. 1994 Expression of LINE-1 retrotransposons in human breast cancer. *Cancer* 73, 2333-2336.
- Brouha, B., Schustak, J., Badge, R. M., Lutz-Prigge, S., Farley, A. H., Moran, J. V., and Kazazian, H. H., Jr. 2003 Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5280-5285.
- Buzdin, A., Gogvadze, E., and Lebrun, M. H. 2007 Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in LINE amplification. *FEBS Lett* 581, 2877-2882.
- Callinan, P. A., Wang, J., Herke, S. W., Garber, R. K., Liang, P., and Batzer, M. A. 2005 Alu retrotransposition-mediated deletion. *J Mol Biol* 348, 791-800.
- Campione-Piccardo, J., Rawls, W. E., and Bacchetti, S. 1979 Selective assay for herpes simplex viruses expressing thymidine kinase. *J Virol* 31, 281-287.
- Chen, H., Lilley, C. E., Yu, Q., Lee, D. V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N. R., and Weitzman, M. D. 2006 APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol* 16, 480-485.
- Chen, L. L., DeCerbo, J. N., and Carmichael, G. G. 2008 Alu element-mediated gene silencing. *EMBO J* 27, 1694-1705.
- Chiu, Y. L., Soros, V. B., Kreisberg, J. F., Stopak, K., Yonemoto, W., and Greene, W. C. 2005 Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 435, 108-114.
- Chiu, Y. L., Witkowska, H. E., Hall, S. C., Santiago, M., Soros, V. B., Esnault, C., Heidmann, T., and Greene, W. C. 2006 High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15588-15593.

- Chiu, Y. L. and Greene, W. C. 2008 The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* 26, 317-353.
- Cho, D. S., Yang, W., Lee, J. T., Shiekhata, R., Murray, J. M., and Nishikura, K. 2003 Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA. *J Biol Chem* 278, 17093-17102.
- Conticello, S. G., Thomas, C. J., Petersen-Mahrt, S. K., and Neuberger, M. S. 2005 Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 22, 367-377.
- Conticello, S. G., Langlois, M. A., Yang, Z., and Neuberger, M. S. 2007 DNA deamination in immunity: AID in the context of its APOBEC relatives. *Adv Immunol* 94, 37-73.
- Cordaux, R. and Batzer, M. A. 2009 The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 10, 691-703.
- Cost, G. J. and Boeke, J. D. 1998 Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry* 37, 18081-18093.
- Cost, G. J., Feng, Q., Jacquier, A., and Boeke, J. D. 2002 Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* 21, 5899-5910.
- Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., Mu, Y., Lovci, M. T., Morell, M., O'Shea, K. S., Moran, J. V., and Gage, F. H. 2009 L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127-1131.
- Damert, A., Raiz, J., Horn, A. V., Lower, J., Wang, H., Xing, J., Batzer, M. A., Lower, R., and Schumann, G. G. 2009 5'-Transducing SVA retrotransposon groups spread efficiently throughout the human genome. *Genome Res*.
- Dang, Y., Wang, X., Esselman, W. J., and Zheng, Y. H. 2006 Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol* 80, 10522-10533.
- Deininger, P. L. and Batzer, M. A. 2002 Mammalian retroelements. *Genome Res* 12, 1455-1465.
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J. P., and Schwartz, O. 2006 Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* 80, 605-614.
- Dewannieux, M., Esnault, C., and Heidmann, T. 2003 LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 35, 41-48.
- Dewannieux, M., Blaise, S., and Heidmann, T. 2005 Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *J Virol* 79, 15573-15577.
- Dewannieux, M. and Heidmann, T. 2005 LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet Genome Res* 110, 35-48.
- Dizdaroglu, M., Karakaya, A., Jaruga, P., Slupphaug, G., and Krokan, H. E. 1996 Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 24, 418-422.

- Dombroski, B. A., Mathias, S. L., Nanthakumar, E., Scott, A. F., and Kazazian, H. H., Jr. 1991 Isolation of an active human transposable element. *Science* 254, 1805-1808.
- Dombroski, B. A., Scott, A. F., and Kazazian, H. H., Jr. 1993 Two additional potential retrotransposons isolated from a human L1 subfamily that contains an active retrotransposable element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6513-6517.
- Elroy-Stein, O. and Moss, B. 1990 Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6743-6747.
- Ergun, S., Buschmann, C., Heukeshoven, J., Dammann, K., Schnieders, F., Lauke, H., Chalajour, F., Kilic, N., Stratling, W. H., and Schumann, G. G. 2004 Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem* 279, 27753-27763.
- Esnault, C., Maestre, J., and Heidmann, T. 2000 Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 24, 363-367.
- Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A. J., Heidmann, T., and Schwartz, O. 2005 APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 433, 430-433.
- Fanning, T. and Singer, M. 1987 The LINE-1 DNA sequences in four mammalian orders predict proteins that conserve homologies to retrovirus proteins. *Nucleic Acids Res* 15, 2251-2260.
- Feng, Q., Moran, J. V., Kazazian, H. H., Jr., and Boeke, J. D. 1996 Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87, 905-916.
- Fuerst, T. R. and Moss, B. 1989 Structure and stability of mRNA synthesized by vaccinia virus-encoded bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. Importance of the 5' untranslated leader. *J Mol Biol* 206, 333-348.
- Gallois-Montbrun, S., Kramer, B., Swanson, C. M., Byers, H., Lynham, S., Ward, M., and Malim, M. H. 2007 Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol* 81, 2165-2178.
- Garcia-Perez, J. L., Doucet, A. J., Bucheton, A., Moran, J. V., and Gilbert, N. 2007a Distinct mechanisms for trans-mediated mobilization of cellular RNAs by the LINE-1 reverse transcriptase. *Genome Res* 17, 602-611.
- Garcia-Perez, J. L., Marchetto, M. C., Muotri, A. R., Coufal, N. G., Gage, F. H., O'Shea, K. S., and Moran, J. V. 2007b LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 16, 1569-1577.
- Gasior, S. L., Wakeman, T. P., Xu, B., and Deininger, P. L. 2006 The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol* 357, 1383-1393.
- Gasior, S. L., Roy-Engel, A. M., and Deininger, P. L. 2008 ERCC1/XPF limits L1 retrotransposition. *DNA Repair (Amst)* 7, 983-989.
- Georgiou, I., Noutsopoulos, D., Dimitriadou, E., Markopoulos, G., Apergi, A., Lazaros, L., Vaxevanoglou, T., Pantos, K., Syrou, M., and Tzavaras, T. 2009 Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Hum Mol Genet* 18, 1221-1228.

- Gilbert, N., Lutz-Prigge, S., and Moran, J. V. 2002 Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell* 110, 315-325.
- Gilbert, N., Lutz, S., Morrish, T. A., and Moran, J. V. 2005 Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells. *Mol Cell Biol* 25, 7780-7795.
- Goodier, J. L., Ostertag, E. M., Engleka, K. A., Seleme, M. C., and Kazazian, H. H., Jr. 2004 A potential role for the nucleolus in L1 retrotransposition. *Hum Mol Genet* 13, 1041-1048.
- Goodier, J. L., Zhang, L., Vetter, M. R., and Kazazian, H. H., Jr. 2007 LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol Cell Biol* 27, 6469-6483.
- Goodier, J. L. and Kazazian, H. H., Jr. 2008 Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 135, 23-35.
- Guo, F., Cen, S., Niu, M., Saadatmand, J., and Kleiman, L. 2006 Inhibition of formula-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 80, 11710-11722.
- Han, J. S., Szak, S. T., and Boeke, J. D. 2004 Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 429, 268-274.
- Han, K., Lee, J., Meyer, T. J., Remedios, P., Goodwin, L., and Batzer, M. A. 2008 L1 recombination-associated deletions generate human genomic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19366-19371.
- Hardeland, U., Kunz, C., Focke, F., Szadkowski, M., and Schar, P. 2007 Cell cycle regulation as a mechanism for functional separation of the apparently redundant uracil DNA glycosylases TDG and UNG2. *Nucleic Acids Res* 35, 3859-3867.
- Harris, R. S., Petersen-Mahrt, S. K., and Neuberger, M. S. 2002 RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* 10, 1247-1253.
- Harris, R. S., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Malim, M. H., and Neuberger, M. S. 2003 DNA deamination: not just a trigger for antibody diversification but also a mechanism for defense against retroviruses. *Nat Immunol* 4, 641-643.
- Harris, R. S. and Liddament, M. T. 2004 Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4, 868-877.
- Hasler, J., Samuelsson, T., and Strub, K. 2007 Useful 'junk': Alu RNAs in the human transcriptome. *Cell Mol Life Sci* 64, 1793-1800.
- Hattori, M., Hidaka, S., and Sakaki, Y. 1985 Sequence analysis of a KpnI family member near the 3' end of human beta-globin gene. *Nucleic Acids Res* 13, 7813-7827.
- Haushalter, K. A., Todd Stukenberg, M. W., Kirschner, M. W., and Verdine, G. L. 1999 Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr Biol* 9, 174-185.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H. H., Jiricny, J., and Bird, A. 1999 The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401, 301-304.

- Henry, M., Guetard, D., Suspene, R., Rusniok, C., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J. P. 2009 Genetic editing of HBV DNA by monodomain human APOBEC3 cytidine deaminases and the recombinant nature of APOBEC3G. *PLoS One* 4, e4277.
- Hohjoh, H. and Singer, M. F. 1996 Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J* 15, 630-639.
- Holmes, E. C. 2007 Ancient lentiviruses leave their mark. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6095-6096.
- Holmes, R. K., Malim, M. H., and Bishop, K. N. 2007 APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* 32, 118-128.
- Holmes, S. E., Singer, M. F., and Swergold, G. D. 1992 Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *J Biol Chem* 267, 19765-19768.
- Huthoff, H., Autore, F., Gallois-Montbrun, S., Fraternali, F., and Malim, M. H. 2009 RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathog* 5, e1000330.
- Ikeda, T., Ohsugi, T., Kimura, T., Matsushita, S., Maeda, Y., Harada, S., and Koito, A. 2008 The antiretroviral potency of APOBEC1 deaminase from small animal species. *Nucleic Acids Res* 36, 6859-6871.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., and Navaratnam, N. 2002 An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79, 285-296.
- Jurka, J. 1997 Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1872-1877.
- Kaiser, S. M. and Emerman, M. 2006 Uracil DNA glycosylase is dispensable for human immunodeficiency virus type 1 replication and does not contribute to the antiviral effects of the cytidine deaminase Apobec3G. *J Virol* 80, 875-882.
- Kapitonov, V. V. and Jurka, J. 2003 The esterase and PHD domains in CR1-like non-LTR retrotransposons. *Mol Biol Evol* 20, 38-46.
- Kazazian, H. H., Jr. 2004 Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- Khazina, E. and Weichenrieder, O. 2009 Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 731-736.
- Kimberland, M. L., Divoky, V., Prchal, J., Schwahn, U., Berger, W., and Kazazian, H. H., Jr. 1999 Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet* 8, 1557-1560.
- Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A., Kurata, T., Sata, T., and Tokunaga, K. 2007 All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 35, 2955-2964.
- Klein, A. M. 2007 Lokalisation von APOBEC3-Proteinen und deren Interaktion mit dem humanen LINE-1-RNP-Komplex. Diplomarbeit

- Kohli, R. M., Abrams, S. R., Gajula, K. S., Maul, R. W., Gearhart, P. J., and Stivers, J. T. 2009 A portable hot spot recognition loop transfers sequence preferences from APOBEC family members to activation-induced cytidine deaminase. *J Biol Chem* 284, 22898-22904.
- Kondo, Y. and Issa, J. P. 2003 Enrichment for histone H3 lysine 9 methylation at Alu repeats in human cells. *J Biol Chem* 278, 27658-27662.
- Kozak, S. L., Marin, M., Rose, K. M., Bystrom, C., and Kabat, D. 2006 The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem* 281, 29105-29119.
- Kubo, S., Seleme, M. C., Soifer, H. S., Perez, J. L., Moran, J. V., Kazazian, H. H., Jr., and Kasahara, N. 2006 L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8036-8041.
- Kubota, Y., Nash, R. A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D. E., and Lindahl, T. 1996 Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 15, 6662-6670.
- Kulpa, D. A. and Moran, J. V. 2005 Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Hum Mol Genet* 14, 3237-3248.
- Kulpa, D. A. and Moran, J. V. 2006 Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat Struct Mol Biol* 13, 655-660.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C. *et al.* 2001 Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- LaRue, R. S., Andresdottir, V., Blanchard, Y., Conticello, S. G., Derse, D., Emerman, M., Greene, W. C., Jonsson, S. R., Landau, N. R., Lochelt, M., Malik, H. S., Malim, M. H., Munk, C., O'Brien, S. J., Pathak, V. K., Strebel, K., Wain-Hobson, S., Yu, X. F., Yuhki, N., and Harris, R. S. 2009 Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J Virol* 83, 494-497.
- Lavie, L., Maldener, E., Brouha, B., Meese, E. U., and Mayer, J. 2004 The human L1 promoter: variable transcription initiation sites and a major impact of upstream flanking sequence on promoter activity. *Genome Res* 14, 2253-2260.
- Lee, Y. N. and Bieniasz, P. D. 2007 Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog* 3, e10.
- Lee, Y. N., Malim, M. H., and Bieniasz, P. D. 2008 Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. *J Virol* 82, 8762-8770.
- Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J., and Harris, R. S. 2004 APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 14, 1385-1391.
- Lindahl, T. 1974 An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3649-3653.
- Lindahl, T., Karran, P., and Wood, R. D. 1997 DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* 7, 158-169.
- Lovsin, N. and Peterlin, B. M. 2009 APOBEC3 proteins inhibit LINE-1 retrotransposition in the absence of ORF1p binding. *Ann N Y Acad Sci* 1178, 268-275.

- Lower, R., Boller, K., Hasenmaier, B., Korbmacher, C., Muller-Lantzsch, N., Lower, J., and Kurth, R. 1993 Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4480-4484.
- Lower, R., Lower, J., and Kurth, R. 1996 The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5177-5184.
- Luan, D. D., Korman, M. H., Jakubczak, J. L., and Eickbush, T. H. 1993 Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72, 595-605.
- Luo, K., Wang, T., Liu, B., Tian, C., Xiao, Z., Kappes, J., and Yu, X. F. 2007 Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* 81, 7238-7248.
- Lyon, M. F. 2006 Do LINEs Have a Role in X-Chromosome Inactivation? *J Biomed Biotechnol* 2006, 59746.
- MacDuff, D. A., Demorest, Z. L., and Harris, R. S. 2009 AID can restrict L1 retrotransposition suggesting a dual role in innate and adaptive immunity. *Nucleic Acids Res* 37, 1854-1867.
- Mahieux, R., Suspene, R., Delebecque, F., Henry, M., Schwartz, O., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J. P. 2005 Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *J Gen Virol* 86, 2489-2494.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. 2003 Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N. R. 2003 Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114, 21-31.
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L., and Kabat, D. 2003 HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9, 1398-1403.
- Martin, S. L. 1991 Ribonucleoprotein particles with LINE-1 RNA in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 11, 4804-4807.
- Martin, S. L., Li, W. L., Furano, A. V., and Boissinot, S. 2005 The structures of mouse and human L1 elements reflect their insertion mechanism. *Cytogenet Genome Res* 110, 223-228.
- Martin, S. L. 2006 The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During L1 Retrotransposition. *J Biomed Biotechnol* 2006, 45621.
- Mathias, S. L., Scott, A. F., Kazazian, H. H., Jr., Boeke, J. D., and Gabriel, A. 1991 Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254, 1808-1810.
- Mathias, S. L. and Scott, A. F. 1993 Promoter binding proteins of an active human L1 retrotransposon. *Biochem Biophys Res Commun* 191, 625-632.
- Matlik, K., Redik, K., and Speek, M. 2006 L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes. *J Biomed Biotechnol* 2006, 71753.

- Matsumoto, Y. and Kim, K. 1995 Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269, 699-702.
- McCLINTOCK, B. 1950 The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 36, 344-355.
- Mehta, A., Kinter, M. T., Sherman, N. E., and Driscoll, D. M. 2000 Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA-binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 1846-1854.
- Meischl, C., Boer, M., Ahlin, A., and Roos, D. 2000 A new exon created by intronic insertion of a rearranged LINE-1 element as the cause of chronic granulomatous disease. *Eur J Hum Genet* 8, 697-703.
- Mills, R. E., Bennett, E. A., Iskow, R. C., Luttig, C. T., Tsui, C., Pittard, W. S., and Devine, S. E. 2006 Recently mobilized transposons in the human and chimpanzee genomes. *Am J Hum Genet* 78, 671-679.
- Mills, R. E., Bennett, E. A., Iskow, R. C., and Devine, S. E. 2007 Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet* 23, 183-191.
- Minakami, R., Kurose, K., Etoh, K., Furuhashi, Y., Hattori, M., and Sakaki, Y. 1992 Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s) binding to the element. *Nucleic Acids Res* 20, 3139-3145.
- Mine, M., Chen, J. M., Brivet, M., Desguerre, I., Marchant, D., de Lonlay, P., Bernard, A., Ferec, C., Abitbol, M., Ricquier, D., and Marsac, C. 2007 A large genomic deletion in the PDHX gene caused by the retrotranspositional insertion of a full-length LINE-1 element. *Hum Mutat* 28, 137-142.
- Montoya-Durango, D. E., Liu, Y., Teneng, I., Kalbfleisch, T., Lacy, M. E., Steffen, M. C., and Ramos, K. S. 2009 Epigenetic control of mammalian LINE-1 retrotransposon by retinoblastoma proteins. *Mutat Res* 665, 20-28.
- Moran, J. V., Holmes, S. E., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Boeke, J. D., and Kazazian, H. H., Jr. 1996 High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87, 917-927.
- Moran, J. V., DeBerardinis, R. J., and Kazazian, H. H., Jr. 1999 Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283, 1530-1534.
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W., and Petersen-Mahrt, S. K. 2004 Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 279, 52353-52360.
- Morrish, T. A., Gilbert, N., Myers, J. S., Vincent, B. J., Stamato, T. D., Taccioli, G. E., Batzer, M. A., and Moran, J. V. 2002 DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 31, 159-165.
- Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perkovic, M., Lower, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G. G., and Munk, C. 2006 APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem* 281, 22161-22172.

- Mueller-Lantzsch, N., Sauter, M., Weiskircher, A., Kramer, K., Best, B., Buck, M., and Grasser, F. 1993 Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 343-350.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., and Honjo, T. 1999 Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-18476.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. 2000 Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.
- Muster, T., Waltenberger, A., Grassauer, A., Hirschl, S., Caucig, P., Romirer, I., Fodinger, D., Sepele, H., Schanab, O., Magin-Lachmann, C., Lower, R., Jansen, B., Pehamberger, H., and Wolff, K. 2003 An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* 63, 8735-8741.
- Navaratnam, N., Fujino, T., Bayliss, J., Jarmuz, A., How, A., Richardson, N., Somasekaram, A., Bhattacharya, S., Carter, C., and Scott, J. 1998 Escherichia coli cytidine deaminase provides a molecular model for ApoB RNA editing and a mechanism for RNA substrate recognition. *J Mol Biol* 275, 695-714.
- Navarro, F., Bollman, B., Chen, H., Konig, R., Yu, Q., Chiles, K., and Landau, N. R. 2005 Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 333, 374-386.
- Nguyen, D. H. and Hu, J. 2008 Reverse transcriptase- and RNA packaging signal-dependent incorporation of APOBEC3G into hepatitis B virus nucleocapsids. *J Virol* 82, 6852-6861.
- Niewiadomska, A. M., Tian, C., Tan, L., Wang, T., Sarkis, P. T., and Yu, X. F. 2007 Differential inhibition of long interspersed element 1 by APOBEC3 does not correlate with high-molecular-mass-complex formation or P-body association. *J Virol* 81, 9577-9583.
- Nigumann, P., Redik, K., Matlik, K., and Speek, M. 2002 Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon. *Genomics* 79, 628-634.
- Novina, C. D. and Sharp, P. A. 2004 The RNAi revolution. *Nature* 430, 161-164.
- OhAinle, M., Kerns, J. A., Li, M. M., Malik, H. S., and Emerman, M. 2008 Antiretroelement activity of APOBEC3H was lost twice in recent human evolution. *Cell Host Microbe* 4, 249-259.
- Oka, K., Kobayashi, K., Sullivan, M., Martinez, J., Teng, B. B., Ishimura-Oka, K., and Chan, L. 1997 Tissue-specific inhibition of apolipoprotein B mRNA editing in the liver by adenovirus-mediated transfer of a dominant negative mutant APOBEC-1 leads to increased low density lipoprotein in mice. *J Biol Chem* 272, 1456-1460.
- Olsen, L. C., Aasland, R., Wittwer, C. U., Krokan, H. E., and Helland, D. E. 1989 Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J* 8, 3121-3125.
- Ostertag, E. M. and Kazazian, H. H., Jr. 2001a Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res* 11, 2059-2065.

- Ostertag, E. M. and Kazazian, H. H., Jr. 2001b Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35, 501-538.
- Pardue, M. L., Danilevskaya, O. N., Lowenhaupt, K., Slot, F., and Traverse, K. L. 1996 *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. *Trends Genet* 12, 48-52.
- Perepelitsa-Belancio, V. and Deininger, P. 2003 RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nat Genet* 35, 363-366.
- Petit, V., Guetard, D., Renard, M., Keriél, A., Sitbon, M., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J. P. 2009 Murine APOBEC1 is a powerful mutator of retroviral and cellular RNA in vitro and in vivo. *J Mol Biol* 385, 65-78.
- Piskareva, O. and Schmatchenko, V. 2006 DNA polymerization by the reverse transcriptase of the human L1 retrotransposon on its own template in vitro. *FEBS Lett* 580, 661-668.
- Priet, S., Navarro, J. M., Gros, N., Querat, G., and Sire, J. 2003 Differential incorporation of uracil DNA glycosylase UNG2 into HIV-1, HIV-2, and SIV(MAC) viral particles. *Virology* 307, 283-289.
- Prochnow, C., Bransteitter, R., Klein, M. G., Goodman, M. F., and Chen, X. S. 2007 The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID. *Nature* 445, 447-451.
- Quentin, Y. 1992 Fusion of a free left Alu monomer and a free right Alu monomer at the origin of the Alu family in the primate genomes. *Nucleic Acids Res* 20, 487-493.
- Rada, C., Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T., and Neuberger, M. S. 2002 Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* 12, 1748-1755.
- Rangwala, S. H. and Kazazian, H. H., Jr. 2009 The L1 retrotransposition assay: a retrospective and toolkit. *Methods* 49, 219-226.
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. 2009 DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 66, 981-993.
- Robson, C. N. and Hickson, I. D. 1991 Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res* 19, 5519-5523.
- Rogozin, I. B., Basu, M. K., Jordan, I. K., Pavlov, Y. I., and Koonin, E. V. 2005 APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* 4, 1281-1285.
- Sassaman, D. M., Dombroski, B. A., Moran, J. V., Kimberland, M. L., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Gabriel, A., Swergold, G. D., and Kazazian, H. H., Jr. 1997 Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16, 37-43.
- Scherer, W. F., SYVERTON, J. T., and GEY, G. O. 1953 Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97, 695-710.

- Schumacher, A. J., Nissley, D. V., and Harris, R. S. 2005 APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9854-9859.
- Schumann, G. G. 2007 APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem Soc Trans* 35, 637-642.
- Scott, A. F., Schmeckpeper, B. J., Abdelrazik, M., Comey, C. T., O'Hara, B., Rossiter, J. P., Cooley, T., Heath, P., Smith, K. D., and Margolet, L. 1987 Origin of the human L1 elements: proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics* 1, 113-125.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., and Malim, M. H. 2002 Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Shi, X., Seluanov, A., and Gorbunova, V. 2007 Cell divisions are required for L1 retrotransposition. *Mol Cell Biol* 27, 1264-1270.
- Shindo, K., Takaori-Kondo, A., Kobayashi, M., Abudu, A., Fukunaga, K., and Uchiyama, T. 2003 The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. *J Biol Chem* 278, 44412-44416.
- Slupphaug, G., Markussen, F. H., Olsen, L. C., Aasland, R., Aarsaether, N., Bakke, O., Krokan, H. E., and Helland, D. E. 1993 Nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase are encoded by the same gene. *Nucleic Acids Res* 21, 2579-2584.
- Slupphaug, G., Eftedal, I., Kavli, B., Bharati, S., Helle, N. M., Haug, T., Levine, D. W., and Krokan, H. E. 1995 Properties of a recombinant human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene and evidence that UNG encodes the major uracil-DNA glycosylase. *Biochemistry* 34, 128-138.
- Smit, A. F. and Riggs, A. D. 1995 MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation. *Nucleic Acids Res* 23, 98-102.
- Smit, A. F. and Riggs, A. D. 1996 Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1443-1448.
- Smit, A. F. 1999 Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9, 657-663.
- Sobol, R. W., Horton, J. K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R. K., Prasad, R., Rajewsky, K., and Wilson, S. H. 1996 Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* 379, 183-186.
- Soifer, H. S., Zaragoza, A., Peyvan, M., Behlke, M. A., and Rossi, J. J. 2005 A potential role for RNA interference in controlling the activity of the human LINE-1 retrotransposon. *Nucleic Acids Res* 33, 846-856.
- Sorek, R. 2007 The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences. *RNA* 13, 1603-1608.
- Soros, V. B., Yonemoto, W., and Greene, W. C. 2007 Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog* 3, e15.

- Speek, M. 2001 Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol* 21, 1973-1985.
- Stauch, B., Hofmann, H., Perkovic, M., Weisel, M., Kopietz, F., Cichutek, K., Munk, C., and Schneider, G. 2009 Model structure of APOBEC3C reveals a binding pocket modulating ribonucleic acid interaction required for encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12079-12084.
- Stenglein, M. D. and Harris, R. S. 2006 APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem* 281, 16837-16841.
- Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T., and Medzhitov, R. 2008 Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587-598.
- Suspene, R., Sommer, P., Henry, M., Ferris, S., Guetard, D., Pochet, S., Chester, A., Navaratnam, N., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J. P. 2004 APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* 32, 2421-2429.
- Sutter, G. and Moss, B. 1992 Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10847-10851.
- Suzuki, J., Yamaguchi, K., Kajikawa, M., Ichianagi, K., Adachi, N., Koyama, H., Takeda, S., and Okada, N. 2009 Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genet* 5, e1000461.
- Svarovskaia, E. S., Xu, H., Mbisa, J. L., Barr, R., Gorelick, R. J., Ono, A., Freed, E. O., Hu, W. S., and Pathak, V. K. 2004 Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 279, 35822-35828.
- Swergold, G. D. 1990 Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol Cell Biol* 10, 6718-6729.
- Symer, D. E., Connelly, C., Szak, S. T., Caputo, E. M., Cost, G. J., Parmigiani, G., and Boeke, J. D. 2002 Human I1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell* 110, 327-338.
- Szak, S. T., Pickeral, O. K., Makalowski, W., Boguski, M. S., Landsman, D., and Boeke, J. D. 2002 Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biol* 3, research0052.
- Takasu, M., Hayashi, R., Maruya, E., Ota, M., Imura, K., Kougo, K., Kobayashi, C., Saji, H., Ishikawa, Y., Asai, T., and Tokunaga, K. 2007 Deletion of entire HLA-A gene accompanied by an insertion of a retrotransposon. *Tissue Antigens* 70, 144-150.
- Tan, L., Sarkis, P. T., Wang, T., Tian, C., and Yu, X. F. 2009 Sole copy of Z2-type human cytidine deaminase APOBEC3H has inhibitory activity against retrotransposons and HIV-1. *FASEB J* 23, 279-287.
- Tchenio, T., Casella, J. F., and Heidmann, T. 2000 Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons. *Nucleic Acids Res* 28, 411-415.
- Teng, B., Burant, C. F., and Davidson, N. O. 1993 Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 260, 1816-1819.

- Thayer, R. E., Singer, M. F., and Fanning, T. G. 1993 Undermethylation of specific LINE-1 sequences in human cells producing a LINE-1-encoded protein. *Gene* 133, 273-277.
- Thomas, C. A., Jr. 1971 The genetic organization of chromosomes. *Annu Rev Genet* 5, 237-256.
- Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M. I., Kidd, K. K., and Lenz, J. 2001 Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 11, 1531-1535.
- van den Hurk, J. A., Meij, I. C., Seleme, M. C., Kano, H., Nikopoulos, K., Hoefsloot, L. H., Sistermans, E. A., de Wijs, I. J., Mukhopadhyay, A., Plomp, A. S., de Jong, P. T., Kazazian, H. H., and Cremers, F. P. 2007 L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum Mol Genet* 16, 1587-1592.
- Visnes, T., Doseth, B., Pettersen, H. S., Hagen, L., Sousa, M. M., Akbari, M., Otterlei, M., Kavli, B., Slupphaug, G., and Krokan, H. E. 2009 Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 563-568.
- Wang, N., Trend, B., Bronson, D. L., and Fraley, E. E. 1980 Nonrandom abnormalities in chromosome 1 in human testicular cancers. *Cancer Res* 40, 796-802.
- Wang, S. M. and Wang, C. T. 2009 APOBEC3G cytidine deaminase association with coronavirus nucleocapsid protein. *Virology* 388, 112-120.
- Wang, T., Tian, C., Zhang, W., Luo, K., Sarkis, P. T., Yu, L., Liu, B., Yu, Y., and Yu, X. F. 2007 7SL RNA mediates virion packaging of the antiviral cytidine deaminase APOBEC3G. *J Virol* 81, 13112-13124.
- Wang, T., Tian, C., Zhang, W., Sarkis, P. T., and Yu, X. F. 2008a Interaction with 7SL RNA but not with HIV-1 genomic RNA or P bodies is required for APOBEC3F virion packaging. *J Mol Biol* 375, 1098-1112.
- Wang, T., Zhang, W., Tian, C., Liu, B., Yu, Y., Ding, L., Spearman, P., and Yu, X. F. 2008b Distinct viral determinants for the packaging of human cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3C. *Virology* 377, 71-79.
- Wei, W., Morrish, T. A., Alisch, R. S., and Moran, J. V. 2000 A transient assay reveals that cultured human cells can accommodate multiple LINE-1 retrotransposition events. *Anal Biochem* 284, 435-438.
- Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S. L., Lawler, J. F., Ostertag, E. M., Kazazian, H. H., Boeke, J. D., and Moran, J. V. 2001 Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol Cell Biol* 21, 1429-1439.
- Weichenrieder, O., Wild, K., Strub, K., and Cusack, S. 2000 Structure and assembly of the Alu domain of the mammalian signal recognition particle. *Nature* 408, 167-173.
- Whitelaw, E. and Martin, D. I. 2001 Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet* 27, 361-365.
- Wichroski, M. J., Robb, G. B., and Rana, T. M. 2006 Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog* 2, e41.

- Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Bogerd, H. P., and Cullen, B. R. 2004 A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J* 23, 2451-2458.
- Woodcock, D. M., Lawler, C. B., Linsenmeyer, M. E., Doherty, J. P., and Warren, W. D. 1997 Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 272, 7810-7816.
- Xie, K., Sowden, M. P., Dance, G. S., Torelli, A. T., Smith, H. C., and Wedekind, J. E. 2004 The structure of a yeast RNA-editing deaminase provides insight into the fold and function of activation-induced deaminase and APOBEC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8114-8119.
- Xing, J., Wang, H., Belancio, V. P., Cordaux, R., Deininger, P. L., and Batzer, M. A. 2006 Emergence of primate genes by retrotransposon-mediated sequence transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17608-17613.
- Xing, J., Witherspoon, D. J., Ray, D. A., Batzer, M. A., and Jorde, L. B. 2007 Mobile DNA elements in primate and human evolution. *Am J Phys Anthropol* Suppl 45, 2-19.
- Yang, B., Chen, K., Zhang, C., Huang, S., and Zhang, H. 2007 Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem* 282, 11667-11675.
- Yang, N., Zhang, L., Zhang, Y., and Kazazian, H. H., Jr. 2003 An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 31, 4929-4940.
- Yang, N. and Kazazian, H. H., Jr. 2006 L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 763-771.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. 1997 Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13, 335-340.
- Yu, F., Zingler, N., Schumann, G., and Stratling, W. H. 2001 Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res* 29, 4493-4501.
- Yu, Q., Konig, R., Pillai, S., Chiles, K., Kearney, M., Palmer, S., Richman, D., Coffin, J. M., and Landau, N. R. 2004 Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* 11, 435-442.
- Yu, Q., Chen, D., Konig, R., Mariani, R., Unutmaz, D., and Landau, N. R. 2004 APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem* 279, 53379-53386.
- Zhang, X. H. and Chasin, L. A. 2006 Comparison of multiple vertebrate genomes reveals the birth and evolution of human exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13427-13432.
- Zhang, Z., Harrison, P. M., Liu, Y., and Gerstein, M. 2003 Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res* 13, 2541-2558.
- Zingler, N., Willhoeft, U., Brose, H. P., Schoder, V., Jahns, T., Hanschmann, K. M., Morrish, T. A., Lower, J., and Schumann, G. G. 2005a Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining. *Genome Res* 15, 780-789.

- Zingler, N., Weichenrieder, O., and Schumann, G. G. 2005b APE-type non-LTR retrotransposons: determinants involved in target site recognition. *Cytogenet Genome Res* 110, 250-268.

Anhang A

Vergleich der 5'-Enden 5'-verkürzter *de novo* L1-Insertionen, die in Symer *et al.* (2002) und Gilbert *et al.* (2005) publiziert wurden, mit der L1.3-Referenzsequenz. Das letzte L1-kodierte Nukleotid am 5'-Ende der Insertion ist mit der Position beschriftet, die es in der L1.3-Referenzsequenz besitzt. Der schwarze Rahmen markiert die Position des ersten, nicht integrierten L1-Nukleotids. Neben der Nukleotidsequenz der *de novo* L1-Insertion (grüne Schrift) sind auch die Nukleotidsequenz der TSDs (rote Schrift) sowie diejenigen Nukleotide gekennzeichnet, die am 5'-Ende der L1-Insertion zusätzlich inseriert wurden (unterstrichene Schrift).

Gilbert *et al.* (2005)

```

3-3HindIIILRE2:                                21
      5'-TAAGTAGAATGAAAACCAGAGATGGCCGAATAG
L1.3   5'-.....GAGCCAAGATGGCCGAATAG

1BamHIL1.3:                                    5632
      5'-TCACCCCTTAGAAGTCCAACCAATGTCCAACAATGAT
L1.3   5'-.....CCAACCACAATGTCCAACAATGAT

26HindIIIL1.3:                                5974
      5'-TCCGTTAGTTACATATGTAACTAACCCGATCCGAAC
L1.3   5'-....ATGTATACATATGTAACTAACCCGATCCGAAC

8BglIIIL1.3:                                  5717
      5'-ATGGTTGTAGAAGACATGTCCTTTGTAGGGACATGG
L1.3   5'-.....TGAGTTCATATCCTTTGTAGGGACATGG

9BglIIIIIL1.3:                                5311
      5'-GGCTAGCAGTGTCAAAATCAAAAACCACTATGAGATA
L1.3   5'-.....AATCAAAATCAAAAACCACTATGAGATA

4-2HindIIILRE2:                                5971
      5'-ACATCAGAAAGGTATACATATGTAACTAACCCGATC
L1.3   5'-.....CACATGTATACATATGTAACTAACCCGATC

13HindIIIL1.3:                                5582
      5'-TGACAGAGGTTATGTTTATTGCGGCACTATTCACA
L1.3   5'-.....ACAGTATGTTTATTGCGGCACTATTCACA

3-2HindIIIL1.3:                                5877
      5'-TAATATAAAAATAATGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGG
L1.3   5'-.....GACTGTGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGG

5-1HindIIILRE2:                                3322
      5'-AGAGATTGAAGATTCAACAGGAAGAAGTTGAATCTC
L1.3   5'-.....ACTAAACCAGGAAGAAGTTGAATCTC

5-5HindIIIRP:                                  5266
      5'-CATTTGAAGACATATTTGACACATGAAGAAATGCT
L1.3   5'-.....CAAAAACACATGAAGAAATGCT

3HindIIIL1.2:                                  5351
      5'-GGGTTAATGGTTTTTAAGGGTTTTAATGGCAATCAT
L1.3   5'-.....GTTAGAATGGCAATCAT
  
```

2-1HindIIILRE2: 5245
 5'-TGTTTTATGTTTATGTTTAAATAAGACATTAT
 L1.3 5'-.....AAAAGAGACATTAT

12HindIIIL1.3: 5792
 5'-GTTTACACCGCATATTCTCACTCATAGGTGGGAAT
 L1.3 5'-ACCAACACCGCATATTCTCACTCATAGGTGGGAAT

5-8HindIIIL1.3: 5896
 5'-CCATATTTTGGGAGGGATAGCATTGGGAGATATAC
 L1.3 5'-.....GAGGGGGAGGGATAGCATTGGGAGATATAC

6-1HindIIILRE2: 2049
 5'-GTCCTTCTAAATTCTGCAATTAAAGACACAGAC
 L1.3 5'-...ATGCACTAAATTCTGCAATTAAAGACACAGAC

14HindIIIL1.3: 5798
 5'-CTACCATATTCTCACTCATAGGTGGGAATTGAACA
 L1.3 5'-.ACGCATATTCTCACTCATAGGTGGGAATTGAACA

A-L1.2: 4689
 5'-TTTTTACAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAAT
 L1.3 5'-..TAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAAT

5HindIIIL1.2: 5944
 5'-CTTTTAGAAAGGATACAGGACATGGGTGCAGCGCAC
 L1.3 5'-.....ATTAGTGGGTGCAGCGCAC

2-2HindIIILRE2: 5577
 5'-AAGCTACTCGTATGTTTATTGCGGCACTATTCACAA
 L1.3 5'-..TGCACACGTATGTTTATTGCGGCACTATTCACAA

2-3HindIIILRE2: 5842
 5'-GTCACAAAAATTCTTCCATGATCGACACAGGAAGGG
 L1.3 5'-.....ACATGGACACAGGAAGGG

3-2HindIIILRE2: 562
 5'-AAACCAAAAAAAAATTTTAGGAGCAGGGCACAGACAA
 L1.3 5'-.....CTCTGGGGCAGGGCACAGACAA

5-5HindIIILRE2: 5915
 5'-TCAATAAAATTCTTCTCACTCGATATACCTAATGC
 L1.3 5'-.....TGGCAGATATACCTAATGC

7BgIIIL1.3: 5994
 5'-ATTTTAGAAGTCAGAGGATCCGAACAAACGACCCA
 L1.3 5'-.....CCCGATCCGAACAAACGACCCA

10BgIIIL1.3: 5825
 5'-TTTGCTACTTAACAATGAGATCACATGGACACAGGA
 L1.3 5'-.....AATTGAACAATGAGATCACATGGACACAGGA

21HindIIIL1.3: 5621
 5'-CATGCAGAAATGCAGAGAGCCGAACCAACCCAAATG
 L1.3 5'-.....ACTTGAACCAACCCAAATG

25HindIIIL1.3: 5988
 5'-TCTATACATCACCCGATCCGAACAAACGACCCAACA
 L1.3 5'-.....AACTAACCCGATCCGAACAAACGACCCAACA

29HindIIIL1.3: 5779
 5'-ATATATTTTAAAAAAAACCAAACACCGCATATTCT
 L1.3 5'-.....GCAAGAACAAAAACCAAACACCGCATATTCT

5-3HindIIIL1.3: 5879
 5'-TTTATAAGTTATCACCCTAGTGGGGTCGGGGGAGG
 L1.3 5'-.....CTGTGTTGGGGTCGGGGGAGG

4-2HindIIIRP: 5877
 5'-AACCTCCATTGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGGAGGG
 L1.3 5'-.....GACTGTGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGGAGGG

4-6HindIIIRP: 5847
 5'-TAATATAAGAATGAGGAAGGGGAATATCACACTCTG
 L1.3 5'-.....GACACAGGAAGGGGAATATCACACTCTG

SP101L1.3-F1: 5481
 5'-TTGGGGGGACGAGGGATCTAGAACTAGAAATACCAT
 L1.3 5'-.....TCCTCAGGGATCTAGAACTAGAAATACCAT

SP140L1.3-PC: 5721
 5'-TTTCAAGAAGCCTCTGTAACTCCTTTGTAGGGACAT
 L1.3 5'-.....TCATATCCTTTGTAGGGACAT

SP101L1.3-H1: 6020
 5'-TCTTTAATTCACAAGTTATCGTTTTATTCTGTCTTT
 L1.3 5'-.....CCGTGCGTTTTATTCTGTCTTT

SP101L1.3-5A: 5486
 5'-CCTATTAAACATGTTTGATCCTCTAGAACTAGAA
 L1.3 5'-.....AGGCACTAGAACTAGAA

SP101L1.3-C3: 3837
 5'-ACTAAGTTCTTAAAACTCTCAATAAATTAGGTAT
 L1.3 5'-.....TCATGCTAAAACTCTCAATAAATTAGGTAT

SP140L1.3-PD: 5435
 5'-GCACCAGAACAACACTCTGTAACTAGTTCAACCA
 L1.3 5'-.....TGGCACTGTAACTAGTTCAACCA

Symer *et al.* (2002)

11G10: 5158
 5'-GGAGGCTGAGGCAGAAGAATCACAATGAACTTAAAC
 L1.3 5'-.....AATCTACAATGAACTTAAAC

PQA7: 6126
 5'-ATATTGAAAAGTTCTTGGGAAGCGGTCAGCCCATTTCG
 L1.3 5'-.....CACGAGGAAGCGGTCAGCCCATTTCG

Anhang B

L1.3- und L1.3NZ-Referenzsequenzen. ORF1 (rote Schrift) und ORF2 (grüne Schrift) sind markiert, ebenso der 132 bp-umfassende polymorphe Bereich in der 5'-UTR der L1.3NZ-Referenzsequenz (grau unterlegte Schrift).

L1.3 („*GenBank accession number*“: L19088)

```

1   GGGGGAGGAG CCAAGATGGC CGAATAGGAA CAGCTCCGGT CTACAGCTCC CAGCGTGAGC GACGCAGAAG ACGGTGATTT
81  CTGCATTTC ATCTGAGGTA CCGGGTTCAT CTCACTAGGG AGTGCCAGAC AGTGGGCGCA GGCCAGTGTG TGTGCGCACC
161 GTGCGCGAGC CGAAGCAGGG CGAGGCATTG CCTCACCTGG GAAGCGCAAG GGGTCAGGGA GTTCCCTTTC TGAGTCAAAG
241 AAAGGGGTGA CGTTCGCACC TGGAAAATCG GGTCACTCCC ACCCGAATAT TGCGCTTTTC AGACCGGCTT AAGAAACGGC
321 GCACCACGAG ACTATATCCC ACACCTGGCT CGGAGGGTCC TACGCCACG GAATCTCGCT GATTGCTAGC ACAGCAGTCT
401 GAGATCAAAC TGCAAGGCGG CAACGAGGCT GGGGGAGGGG CGCCCGCCAT TGCCAGGCT TGCTTAGGTA AACAAAGCAG
481 CCGGGAAGCT CGAACTGGGT GGAGCCACC ACAGCTCAAG GAGGCTGCC TGCTCTGTA GGCTCCACCT CTGGGGGCAG
561 GGCACAGACA AACAAAAAGA CAGCAGTAAC CTCTGCAGAC TTAAGTGTC CTGTCTGACA GCTTTGAAGA GAGCAGTGGT
641 TCTCCAGCA CGCAGCTGGA GATCTGAGAA CGGCAGACA GACTGCCTCC TCAAGTGGGT CCCTGACTCC TGACCCCGCA
721 GCAGCCTAAC TGGGAGGCAC CCCCAGCAG GGGCACACTG ACACCTCACA CGGCAGGTA TTCCAACAGA CCTGCAGCTG
801 AGGGTCTGT CTGTTAGAAG GAAACTAAC AACAGAAAG GACATCTACA CCGAAAACCC ATCTGTACAT CACCATCATC
881 AAAGACCAAA AGTAGATAAA ACCACAAAG TGGGGAAAA ACAGAACAGA AAAACTGGAA ACTCTAAAC GCAGAGCGCC
961 TCTCTCTCT CAAAGGAACG CAGTTCCTCA CCAGCAACGG AACAAAGCTG GATGGAGAAT GATTTTGACG AGCTGAGAGA
1041 AGAAGGCTTC AGACGATCAA ATTACTCTGA GCTACGGGAG GACATTCAA CCAAAGGCAA AGAAGTTGAA AACTTTGAAA
1121 AAAATTTAGA AGAATGTATA ACTAGAATA CCAATACAGA GAAGTGCTTA AAGGAGCTGA TGGAGCTGAA AACCAAGGCT
1201 CGAGAACTAC GTGAAGAATG CAGAAGCCTC AGGAGCCGAT GCGATCAACT GGAAGAAAGG GTATCAGCAA TGGAAGATGA
1281 AATGAATGAA ATGAAGCGAG AAGGGAAGTT TAGAGAAAA AGAATAAAAA GAAATGAGCA AAGCCTCCAA GAAATATGGG
1361 ACTATGTGAA AAGACCAAA CTACGTCTGA TTGGTGATCC TGAAAGTGAT GTGGAGAATG GAACCAAGTT GGAAAAACACT
1441 CTGCAGGATA TTATCCAGGA GAACTTCCCC AATCTAGCAA GGCAGGCCAA CGTTCAGATT CAGGAAATAC AGAGAACGCC
1521 ACAAAGATAC TCCTCGAGAA GAGCAACTCC AAGACACATA ATTGTCAGAT TCACCAAAGT TGAAATGAAG GAAAAAATGT
1601 TAAGGGCAGC CAGAGAGAAA GGTGCGGTTA CCCTCAAAG AAAGCCCATC AGACTAACAG TGGATCTCTC GGCAGAAACC
1681 CTACAAGCCA GAAGAGAGTG GGGGCCAATA TTCAACATTC TTAAGAAAA GAATTTTCAA CCCAGAATT CATATCCAGC
1761 CAACTAAGC TTCATAAGT AAGGAGAAAT AAAATACTTT ATAGACAAGC AAATGTTGAG AGATTTTGTC ACCACCAGGC
1841 CTGCCCTAAA AGAGCTCCTG AAGGAAGCGC TAAACATGGA AAGGAACAAC CGGTACCAGC CGCTGCAAAA TCATGCCAAA
1921 ATGTAAGAC CATCGAGACT AGGAAGAAAC TGCATCAACT AATGAGCAA ATCACCAGCT AACATCATA TGACAGGATC
2001 AAATTCACAC ATAACAATAT TAACTTTAAA TATAAATGGA CTAAATTCTG CAATTAAAG ACACAGACTG GCAAGTTGGA
2081 TAAAGAGTCA AGACCATCA GTGTGCTGTA TTCAGGAAAC CCATCTCAG TGCAGAGACA CACATAGGCT CAAAATAAAA
2161 GGATGGAGGA AGATCTACCA AGCCAATGGA AAACAAAAAA AGGCAGGGGT TGCAATCTTA GTCTCTGATA AAACAGACTT
2241 TAAACCAACA AAGATCAAAA GAGACAAAGA AGGCCATTAC ATAATGGTAA AGGGATCAAT TCAACAAGAG GAGCTAACTA
2321 TCCTAAATAT TTATGCACCC AATACAGGAG CACCCAGATT CATAAAGCAA GTCCTCAGTG ACCTACAAAG AGACTTAGAC
2401 TCCCACACAT TAATAATGGG AGACTTTAAC ACCCCACTGT CAACATTAGA CAGATCAACG AGACAGAAAG TCAACAAGGA
2481 TACCCAGGAA TTGAAGCTAG CTCTGCACCA AGCAGACCTA ATAGACATCT ACAGAACTCT CCACCCCAA TCAACAGAAT
2561 ATACCTTTTT TTCAGCACCA CACCACACCT ATTCCAAAAT TGACCACATA GTTGAAGTA AAGCTCTCCT CAGCAAATGT
2641 AAAAGAACAG AAATTATAAC AAATATCTC TCAGACCACA GTGCAATCAA ACTAGAACTC AGGATTAAGA ATCTACTCA
2721 AAGCCGCTCA ACTACATGGA AACTGAACAA CTGCTCCTG AATGACTACT GGTACATAA CGAAATGAAG GCAGAAATAA
2801 AGATGTTCTT TGAAACCAAC GAGAACAAAG ACACCACATA CCAGAATCTC TGGGACGCAT TCAAAGCAGT GTGTAGAGGG
2881 AAATTTATAG CACTAAATGC CTACAAGAGA AAGCAGGAAA GATCCAAAAT TGACACCTA ACATCACAAT TAAAGAACT
2961 AGAAAAGCAA GAGCAAACAC ATTCAAAGC TAGCAGAAG CAAGAAATAA CTAAATCAG AGCAGAACTG AAGGAAATAG
3041 AGACACAAAA AACCTTCAA AAAATCAATG AATCCAGGAG CTGGTTTTT GAAAGGATCA ACAAATTA TAGACCGCTA
3121 GCAAGACTAA TAAAGAAAAA AAGAGAGAAG AATCAAATAG ACACAATAA AAATGATAA GGGGATATCA CCACCGATCC
3201 CACAGAAATA CAACTACCA TCAGAGAATA CTACAACAC CTCTACGCAA ATAACTAGA AAATCTAGAA GAAATGGATA
3281 CATTCTCTGA CACATACACT CTCCAAGAC TAAACCAGGA AGAAGTTGAA TCTCTGAATA GACCAATAAC AGGCTCTGAA
3361 ATTGTGGCAA TAATCAATAG TTTACCAACC AAAAAGAGTC CAGGACCAGA TGGATTCACA GCCGAATCT ACCAGAGGTA
3441 CATGGAGGAA CTGGTACCAT TCCTTCTGAA ACTATTCCAA TCAATAGAAA AAGAGGGAAT CCTCCCTAAC TCATTTTATG

```

3521 AGGCCAGCAT CATTCTGATA CCAAAGCCGG GCAGAGACAC AACCACAAAA GAGAATTTTA GACCAATATC CTIGATGAAC
 3601 ATTGATGCAA AAATCCTCAA TAAAATACTG GCAAACCGAA TCCAGCAGCA CATCAAAAAG CTTATCCACC ATGATCAAGT
 3681 GGGCTTCATC CCTGGGATGC AAGGCTGGTT CAATATACGC AAATCAATAA ATGTAATCCA GCATATAAAC AGAGCCAAAG
 3761 ACAAAAACCA CATGATTATC TCAATAGATG CAGAAAAAGC CTTTGACAAA ATTCAACAAC CCTTCATGCT AAAAATCTCT
 3841 AATAAATTAG GTATTGATGG GACGTATTTT AAAATAATAA GAGCTATCTA TGACAAACCC ACAGCCAATA TCATACTGAA
 3921 TGGGCAAAAA CTGGAAGCAT TCCCTTTGAA AACCGGCACA AGACAGGGAT GCCCTCTCTC ACCGCTCCTA TTCAACATAG
 4001 TGTTGGAAGT TCTGGCCAGG GCAATCAGGC AGGAGAAGGA AATAAAGGGT ATTCAATTAG GAAAAGAGGA AGTCAAATTG
 4081 TCCCTGTTTG CAGACGACAT GATTGTATAT CTAGAAAACC CCATCGTCTC AGCCCAAAAT CTCCTTAAGC TGATAAGCAA
 4161 CTTTCAGCAA GTCTCAGGAT ACAAATCAA TGTACAAAA TCACAAGCAT TCTTATACAC CAACAACAGA CAAACAGAGA
 4241 GCCAAATCAT GGGTGAACCT CCATTGCTAA TTGCTTCAAA GAGAATAAAA TACCTAGGAA TCCAACCTAC AAGGGATGTG
 4321 AAGGACCTCT TCAAGGAGAA CTACAAACCA CTGCTCAAGG AAATAAAGA GGACACAAAC AAATGGAAGA ACATTCCATG
 4401 CTCATGGGTA GGAAGAATCA ATATCGTGAA AATGGCCATA CTGCCCAAGG TAATTTACAG ATTCAATGCC ATCCCCATCA
 4481 AGCTACCAAT GACTTTCTTC ACAGAATTGG AAAAACTAC TTTAAAGTTC ATATGGAACC AAAAAAGAGC CCGCATTGCC
 4561 AAGTCAATCC TAAGCCAAAA GAACAAAGCT GGAGGCATCA CACTACCTGA CTTCAAATA TACTACAAGG CTACAGTAAC
 4641 CAAAACAGCA TGGTACTGGT ACCAAAACAG AGATATAGAT CAATGGAACA GAACAGAGCC CTCAGAAATA ATGCCGCATA
 4721 TCTACAACTA TCTGATCTTT GACAAACCTG AGAAAAACAA GCAATGGGGA AAGGATTCCC TATTTAATAA ATGGTGCTGG
 4801 GAAACTGGC TAGCCATATG TAGAAAGCTG AAAGTGGATC CTTCTCTTAC ACCTTATACA AAAATCAATT CAAGATGGAT
 4881 TAAAGATTTA AACGTTAAAC CTAAAACCAT AAAAACCTA GAAGAAAACC TAGGCATTAC CATTGAGGAC ATAGGCGTGG
 4961 GCAAGGACTT CATGTCCAAA ACACCAAAAG CAATGGCAAC AAAAGACAAA ATTGACAAAT GGGATCTAAT TAAACTAAAG
 5041 AGCTTCTGCA CAGCAAAAAGA AACTACCATC AGAGTGAACA GGCAACCTAC AACATGGGAG AAAATTTTCG CAACCTACTC
 5121 ATCTGACAAA GGGCTAATAT CCAGAATCTA CAATGAACCT AAACAAATTT ACAAGAAAA AACAAACAAC CCCATCAAAA
 5201 AGTGGGCGAA GGACATGAAC AGACACTTCT CAAAAGAAGA CATTATGCA GCCAAAAAC ACATGAAGAA ATGCTCATCA
 5281 TCACTGGCCA TCAGAGAAAT GCAAATCAA ACCACTATGA GATATCATCT CACACCAGTT AGAATGGCAA TCATTAATAA
 5361 GTCAGGAAAC AACAGGTGCT GGAGAGGATG CGGAGAAATA GGAACACTTT TACACTGTTG GTGGGACTGT AAAGTAGTTT
 5441 AACCATTGTG GAAGTCAGTG TGGCGATTCC TCAGGGATCT AGAAGTAGAA ATACCATTG ACCCAGCCAT CCCATTACTG
 5521 GGTATATACC CAAATGAGTA TAAATCATGC TGCTATAAAG ACACATGCAC ACGTATGTTT ATTGCGGCAC TATTACAAT
 5601 AGCAAAGACT TGGAACCAAC CCAAATGTCC AACAATGATA GACTGGATTA AGAAAATGTG GCACATATAC ACCATGGAAT
 5681 ACTATGCAGC CATAAAAAAT GATGAGTTCA TATCCTTTGT AGGGACATGG ATGAAATTGG AAACCATCAT TCTCAGTAAA
 5761 CTATCGCAAG AACAAAAAC CAAACACCGC ATATTCTCAC TCATAGGTGG GAATTGAACA ATGAGATCAC ATGGACACAG
 5841 GAAGGGGAAT ATCACACTCT GGGGACTGTG GTGGGGTCGG GGGAGGGGG AGGGATAGCA TTGGGAGATA TACCTAATGC
 5921 TAGATGACAC ATTAGTGGGT GCAGCGCACC AGCATGGCAC ATGTATACAT ATGTAATAA CCTGCACAA GTGCACATGT
 6001 ACCCTAAAAC TTAGAGTATA ATAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA

L1.3NZ

1 GGGGGAGGAG CCAAGATGGC CGAATAGGAA CAGCTCCGGT CTACAGCTCC CAGCGTGAGC GACGCAGAAG ACGGTGATTT
 81 CTGCATTTCC ATCTGAGGTA CCGGGTTCAT CTCACTAGGG AGTGCCAGAC AGTGGGCGCA GGCCAGTGTG TGTGCGCACC
 161 GTGCGCGAGC CGAAGCAGGG CGAGGCATTG CCTCACCTGG GAAGCGCAAG GGGTCAGGGA GTTCCCTTTC TGAGTCAAAG
 241 AAAGGGGTGA CGGTGCGACC TGGAAAATCG GGTCACTCCC ACCCGAATAT TGCGCTTTTC AGACCGGCTT AAGAAACGGC
 321 GCACCACGAG ACTATATCCC ACACCTGGCT CGGAGGGTCC TACGCCCACG GAATCTCGCT GATTGTAGC ACAGCAGTCT
 401 GAGATCAAAC TGCAAGGCGG CAACGAGGCT GGGGGAGGGG CGCCCGCCAT TGCCAGGCT TGCTTAGGTA AACAAAGCAG
 481 CCGGGAAGCT CGAACTGGGT GGAGCCCACC ACAGCTCAAG GAGGCTGCC TGCTCTGTA GGCTCCACCT CTGGGGGCAG
 561 GGCACAGACA AACAAAAAGA CAGCAGTAAC CTCTGCAGAC TTAAGTGTC CTGTCTGACA GCTTTGAAGA GAGCAGTGGT
 641 TCTCCAGCA CGCAGCTGGA GATCTGAGAA CGGCAGACA GACTGCCTCC TCAAGTGGGT CCCTGACTCC TGACCCCCGA
 721 GCAGCCTAAC TGGGAGGCAC CCCCAGCAG GGGCACACTG ACACCTACA CGGCAGGTAC TCCTCTAAGA CAAACTTCC
 801 AGAGGAATGA TCAGGCAGCA GCATTGCGG TTCACCAATA TCCACTGTTC TGCAGCCACC GCTGCTGATA CCCAGGAAAA
 881 CAGCATCTGG AGTGGACCTC CAGTAAACGT ATTCCAACAG ACCTGCAGCT GAGGGTCTCTG TCTGTTAGAA GGAAACTAA
 961 CAACAGAAAA GGACATCTAC ACCGAAAACC CATCTGTACA TCACCATCAT CAAAGACCAA AAGTAGATA AACCACAAAG
 1041 ATGGGGAAAA AACAGAACAG AAAAATGGA AACTCTAAAA CGCAGAGCGC CTCTCCTCCT CCAAAGGAAC GCAGTTCTCT
 1121 ACCAGCAACG GAACAAAGCT GGATGGAGAA TGATTTTGAC GAGCTGAGAG AAGAAGGCTT CAGACGATCA AATTACTCTG
 1201 AGCTACGGGA GGACATTCAA ACCAAAGGCA AAGAAGTTGA AAACCTTTGAA AAAAATTTAG AAGAATGTAT AACTAGAATA
 1281 ACCAATACAG AGAAGTGCTT AAAGGAGCTG ATGGAGCTGA AAACCAAGGC TCGAGAACTA CGTGAAGAA GCAGAAGCCT
 1361 CAGGAGCCGA TGCATCAAC TGGAAGAAAG GGTATCAGCA ATGGAAGATG AAATGAATGA AATGAAGCGA GAAGGGAAGT

1441 TTAGAGAAAA AAGAATAAAA AGAAATGAGC AAAGCCTCCA AGAAATATGG GACTATGTGA AAAGACCAAA TCTACGTCTG
 1521 ATTGGTGTAC CTGAAAGTGA TGTGGAGAAT GGAACCAAGT TGAAAAACAC TCTGCAGGAT ATTATCCAGG AGAACTTCCC
 1601 CAATCTAGCA AGGCAGGCCA ACGTTCAGAT TCAGGAAATA CAGAGAACGC CACAAAGATA CTCCTCGAGA AGAGCAACTC
 1681 CAAGACACAT AATTGTGAGA TTCACCAAAG TTGAAATGAA GGAAAAATG TTAAGGGCAG CCAGAGAGAA AGGTTCGGGT
 1761 ACCCTCAAAG GAAAGCCCAT CAGACTAACA GTGGATCTCT CGGCAGAAAC CCTACAAGCC AGAAGAGAGT GGGGGCCAAT
 1841 ATTCAACATT CTAAAGAAA AGAATTTTCA ACCCAGAATT TCATATCCAG CCAAATAAG CTCATAAGT GAAGGAGAAA
 1921 TAAAATACTT TATAGACAAG CAAATGTTGA GAGATTTTGT CACCACCAGG CCTGCCCTAA AAGAGCTCCT GAAGGAAGCG
 2001 CTAAACATGG AAAGGAACAA CCGGTACCAG CCGCTGCAAA ATCATGCCAA AATGTAAAGA CCATCGAGAC TAGGAAGAAA
 2081 CTGCATCAAC TAATGAGCAA AATCACCAGC TAACATCATA ATGACAGGAT CAAATTCACA CATAACAATA TTAACTTTAA
 2161 ATATAAATGG ACTAAATTCT GCAATTAAAA GACACAGACT GGCAAGTTGG ATAAAGAGTC AAGACCCATC AGTGTGCTGT
 2241 ATTACAGAAA CCCATCTCAC GTGCAGAGAC ACACATAGGC TCAAAATAAA AGGATGGAGG AAGATCTACC AAGCCAATGG
 2321 AAAACAAAAA AAGGCAGGGG TTGCAATCCT AGTCTCTGAT AAAACAGACT TTAAACCAAC AAAGATCAAA AGAGACAAAG
 2401 AAGGCCATTA CATAATGGTA AAGGGATCAA TTCAACAAGA GGAGCTAACT ATCCTAAATA TTTATGCACC CAATACAGGA
 2481 GCACCCAGAT TCATAAGCA AGTCCTCAGT GACCTACAAA GAGACTTAGA CTCCCACACA TTAATAATGG GAGACTTTAA
 2561 CACCCCACTG TCAACATTAG ACAGATCAAC GAGACAGAAA GTCAACAAGG ATACCCAGGA ATTGAACTCA GCTCTGCACC
 2641 AAGCAGACCT AATAGACATC TACAGAATC TCCACCCCAA ATCAACAGAA TATACCTTTT TTTCAGCACC ACACCACACC
 2721 TATTCCAAAA TTGACCACAT AGTTGGAAGT AAAGCTCTCC TCAGCAAATG TAAAAGAACA GAAATTATAA CAACTATCT
 2801 CTCAGACCAC AGTGCATCA AACTAGAACT CAGGATTAAG AATCTCACTC AAAGCCGCTC AACTACATGG AAAGTGAACA
 2881 ACCTGCTCCT GAATGACTAC TGGGTACATA ACGAAATGAA GGCAGAAATA AAGATGTTCT TTGAAACCAA CGAGAACAAA
 2961 GACACCACAT ACCAGAATCT CTGGGACGCA TTCAAAGCAG TGTGTAGAGG GAAATTTATA GCACTAAATG CCTACAAGAG
 3041 AAAGCAGGAA AGATCCAAAA TTGACACCCT AACATCACA TTAAGAAGAC TAGAAAAGCA AGAGCAAACA CATTCAAAAG
 3121 CTAGCAGAAG GCAAGAAATA ACTAAAATCA GAGCAGAACT GAAGGAAATA GAGACACAAA AAACCTTCA AAAAATCAAT
 3201 GAATCCAGGA GCTGGTTTTT TGAAAGGATC AACAAAATTG ATAGACCGCT AGCAAGACTA ATAAAGAAAA AAAGAGAGAA
 3281 GAATCAAATA GACACAATAA AAAATGATAA AGGGGATATC ACCACCGATC CCACAGAAAT ACAAACTACC ATCAGAGAAT
 3361 ACTACAAACA CCTCTACGCA AATAAACTAG AAAATCTAGA AGAAATGGAT ACATTCTCTG ACACATACAC TCTCCAAGA
 3441 CTAAACCAGG AAGAAGTTGA ATCTCTGAAT AGACCAATAA CAGGCTCTGA AATTGTGGCA ATAATCAATA GTTTACCAAC
 3521 CAAAAAGAGT CCAGGACCAG ATGGATTAC AGCCGAATTC TACCAGAGGT ACATGGAGGA ACTGGTACCA TTCCTTCTGA
 3601 AACTATTCCA ATCAATAGAA AAAGAGGGAA TCCTCCCTAA CTCATTTTAT GAGGCCAGCA TCATTCTGAT ACCAAAGCCG
 3681 GGCAGAGACA CAACCAAAAA AGAGAATTTT AGACCAATAT CCTTGATGAA CATTGATGCA AAAATCCTCA ATAAAATACT
 3761 GGCAAAACCGA ATCCAGCAGC ACATCAAAAA GCTTATCCAC CATGATCAAG TGGGCTTCAT CCCTGGGATG CAAGGCTGGT
 3841 TCAATATACG CAAATCAATA AATGTAATCC AGCATATAAA CAGAGCCAAA GACAAAAACC ACATGATTAT CTCAATAGAT
 3921 GCAGAAAAAG CCTTTGACAA AATTCAACAA CCCTTCATGC TAAAACTCT CAATAAATTA GGTATTGATG GGACGTATTT
 4001 CAAAATAATA AGAGCTATCT ATGACAAACC CACAGCCAAT ATCATACTGA ATGGGCAAAA ACTGGAAGCA TTCCCTTTGA
 4081 AAACCCGCAC AAGACAGGGA TGCCCTCTCT CACCGCTCCT ATTCAACATA GTGTTGGAAG TTCTGGCCAG GGCAATCAGG
 4161 CAGGAGAAGG AAATAAAGGG TATTCAATTA GGAAAAGAGG AAGTCAAATT GTCCCTGTTT GCAGACGACA TGATTGTATA
 4241 TCTAGAAAAC CCCATCGTCT CAGCCCAAAA TCTCCTTAAG CTGATAAGCA ACTTCAGCAA AGTCTCAGGA TACAAAATCA
 4321 ATGTACAAAA ATCACAAGCA TTCTTATACA CCAACAACAG ACAACAGAG AGCCAAATCA TGGGTGAACT CCCATTCTGA
 4401 ATTGCTTCAA AGAGAATAAA ATACCTAGGA ATCCAACCTA CAAGGGATGT GAAGGACCTC TTCAAGGAGA ACTACAAACC
 4481 ACTGCTCAAG GAAATAAAAG AGGACACAAA CAAATGGAAG AACATTCCAT GCTCATGGGT AGGAAGAATC AATATCGTGA
 4561 AAATGGCCAT ACTGCCCAAG GTAATTTACA GATTCAATGC CATCCCCATC AAGCTACCAA TGACTTTCTT CACAGAATTG
 4641 GAAAAAATA CTTTAAAGTT CATATGGAAC CAAAAAGAG CCCGCATTGC CAAGTCAATC CTAAGCCAAA AGAACAAAGC
 4721 TGGAGGCATC ACACTACCTG ACTTCAAAC TACTACAAAG GCTACAGTAA CCAAAACAGC ATGGTACTGG TACCAAAACA
 4801 GAGATATAGA TCAATGGAAC AGAACAGAGC CCTCAGAAAT AATGCCGCAT ATCTACAAC ATCTGATCTT TGACAAACCT
 4881 GAGAAAAACA AGCAATGGGG AAAGGATTCC CTATTTAATA AATGGTGCTG GGAAAACTGG CTAGCCATAT GTAGAAAGCT
 4961 GAAACTGGAT CCCTTCCTTA CACCTTATAC AAAAATCAAT TCAAGATGGA TTAAAGATTT AAACGTTAAA CCTAAAACCA
 5041 TAAAAACCCT AGAAGAAAAC CTAGGCATTA CCATTACAGGA CATAGGCGTG GGCAAGGACT TCATGTCCAA AACACCAAAA
 5121 GCAATGGCAA CAAAAGACAA AATTGACAAA TGGGATCTAA TTAAACTAAA GAGCTTCTGC ACAGCAAAAG AAACCTACCAT
 5201 CAGAGTGAAC AGGCAACCTA CAACATGGGA GAAAAATTTT GCAACCTACT CATCTGACAA AGGGCTAATA TCCAGAATCT
 5281 ACAATGAACT TAAACAAATT TACAAGAAAA AAACAAACAA CCCCATCAAA AAGTGGGCGA AGGACATGAA CAGACACTTC
 5361 TCAAAAGAAG ACATTATATG AGCCAAAAAA CACATGAAGA AATGCTCATC ATCACTGGCC ATCAGAGAAA TGCAAAATCA
 5441 AACCCTATG AGATATCATC TCACACCAGT TAGAATGGCA ATCATTAAAA AGTCAGGAAA CAACAGGTGC TGGAGAGGAT
 5521 GCGGAGAAAT AGGAACACTT TTACTGTGT GGTGGGACTG TAACTAGTT CAACCATTGT GGAAGTCAGT GTGGCGATTG

5601 CTCAGGGATC TAGAACTAGA AATACCATT T GACCCAGCCA TCCCATTACT GGGTATATAC CCAAATGAGT ATAAATCATG
5681 CTGCTATAAA GACACATGCA CACGTATGTT TATTGCGGCA CTATTCACAA TAGCAAAGAC TTGGAACCAA CCCAAATGTC
5761 CAACAATGAT AGACTGGATT AAGAAAATGT GGCACATATA CACCATGGAA TACTATGCAG CCATAAAAAA TGATGAGTTC
5841 ATATCCTTTG TAGGGACATG GATGAAATTG GAAACCATCA TTCTCAGTAA ACTATCGCAA GAACAAAAAA CCAAACACCG
5921 CATATTCTCA CTCATAGGTG GGAATTGAAC AATGAGATCA CATGGACACA GGAAGGGGAA TATCACACTC TGGGGACTGT
6001 GGTGGGGTCG GGGGAGGGGG GAGGGATAGC ATTGGGAGAT ATACCTAATG CTAGATGACA CATTAGTGGG TGCAGCGCAC
6081 CAGCATGGCA CATGTATACA TATGTAATA ACCTGCACAA TGTGCACATG TACCCTAAAA CTTAGAGTAT AATAAAAAAA
6161 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

Versicherung

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 17.11.2009

.....

(Unterschrift)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die „Analyse der Mechanismen der Hemmung des humanen LINE-1-Retrotransposons durch die Cytidineaminasen APOBEC3A und APOBEC3C“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 17.11.2009

.....

(Unterschrift)

Danksagung

Prof. Dr. Johannes Löwer danke ich für die Möglichkeit, am Paul-Ehrlich-Institut unter besten Arbeitsbedingungen meine Promotion anzufertigen, und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Gerald Schumann danke ich für die spannende Aufgabenstellung. Sein Fachwissen und die engagierte Betreuung prägten mein wissenschaftliches Verständnis und waren sehr wertvoll für mich.

Prof. Dr. Rolf Marschalek danke ich für die offizielle Betreuung an der Universität Frankfurt am Main, für das Interesse an meiner Arbeit und für das Erstellen des Gutachtens.

Dr. Roswitha Löwer und Prof. Dr. Carsten Münk danke ich für die konstruktiven Diskussionen und für das stets offene Ohr bei allen Problemen.

Dr. Christel Kamp gilt mein besonderer Dank für die Geduld, einem Biologen statistische Sachverhalte verständlich zu machen.

Dr. Matthias Hamdorf danke ich für die kompetente Hilfe im Umgang mit dem MVA/T7RP-System.

An dieser Stelle möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Fachgebiets Pr2/Retroelemente sowie der Abteilung 6: Medizinische Biotechnologie danken, die mich in allen praktischen und theoretischen Fragen unterstützt haben. Ulrike, Henning, Mario, Benjamin, Robert, Alexandra und allen Praktikanten bin ich für die Hilfe im experimentellen Teil dieser Arbeit dankbar. Nina, Sabine, Sinja, Julija, Liliana, Christiane und Heike danke ich für ihre Anregungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern und meiner Familie, die mich immer wieder ermutigt haben und mir bei kleinen und großen Krisen beistanden.

Bei Rebekka bedanke ich mich für das schnelle Korrekturlesen und die moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Axel Volker Horn
Geburtsdatum: 17.09.1979
Geburtsort: Löbau
Anschrift: Julius-Reiber-Str. 18, 64293 Darmstadt
Telefon: 0172/3752767 (privat)
E-Mail: axelhorn@googlemail.com

Schulbildung

09/1986 - 07/1988 16. Polytechnische Oberschule „Frederic-Joliot-Curie“, Bautzen
09/1988 - 07/1992 12. Polytechnische Oberschule „Kurt Pchalek“, Bautzen
09/1992 - 07/1998 Städtisches Gymnasium, Bautzen
Abschluß: Abitur

09/1998 - 06/1999 Wehrdienst

Studium und Promotion

09/1999 - 03/2005 Studium Biologie
Technische Universität Dresden
Abschluß: Diplom

03/2004 - 03/2005 Diplomarbeit am Lehrstuhl für
Zell- und Molekularbiologie der Pflanzen
unter der Leitung von Prof. Dr. T. Schmidt

Titel der Arbeit:
Molekulare Charakterisierung von BvL2, einem non-LTR-
Retrotransposon aus der Zuckerrübe *Beta vulgaris* L.

04/2005 – 11/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für
Zell- und Molekularbiologie der Pflanzen

seit 12/2005

Promotion im Fachgebiet
Pr2/Retroelemente
am Paul-Ehrlich-Institut in Langen
unter der Leitung von Prof. Dr. G. Schumann

Titel der Arbeit:

Analyse der Mechanismen der Hemmung des humanen
LINE-1-Retrotransposons durch die Cytidineaminasen
APOBEC3A und APOBEC3C

Publikationen

Damert, A., Raiz, J., **Horn, A. V.**, Lower, J., Wang, H., Xing, J., Batzer, M. A., Lower, R., and Schumann, G. G. 2009 5'-Transducing SVA retrotransposon groups spread efficiently throughout the human genome. *Genome Res* 19, 1992-2008.

Kirilyuk, A., Tolstonog, G. V., Damert, A., Held, U., Hahn, S., Lower, R., Buschmann, C., **Horn, A. V.**, Traub, P., and Schumann, G. G. 2008 Functional endogenous LINE-1 retrotransposons are expressed and mobilized in rat chloroleukemia cells. *Nucleic Acids Res* 36, 648-665.

Wenke, T., Holtgrawe, D., **Horn, A. V.**, Weisshaar, B., and Schmidt, T. 2009 An abundant and heavily truncated non-LTR retrotransposon (LINE) family in *Beta vulgaris*. *Plant Mol Biol.* („Epub ahead of print“)

Posterpräsentationen

Horn AV, Münk C, Löwer J, Schumann GG

„Uncovering the mechanism of LINE-1 inhibition by human APOBEC3 proteins“

(01.09. - 05.09.2007) „Third European Congress of Virology“, Nürnberg

Horn AV, Kamp C, Löwer J, Münk C, Schumann GG

„Uncovering the mechanism of LINE-1 inhibition by human APOBEC3 proteins“

(12.09. - 14.09. 2007) Forschungs-„Retreat“ des Paul-Ehrlich-Instituts, Fürth

Kirilyuk A, Tolstonog G, Damert A, Held U, Hahn S, Löwer R, Buschmann C, **Horn AV**, Traub P, Schumann GG

„Functional endogenous LINE-1 retrotransposons are mobilized in rat chloroleukemia cells and interact with cellular intermediate filaments“

(20.04. - 23.04.2008) „International Congress on Transposable Elements“, Saint Malo, Frankreich

Vorträge

Horn AV, Münk C, Schumann GG

„*Regulation of LINE-1 retrotransposition by APOBEC3 proteins*”

(31.08. - 01.09.2006) Forschungs-„*Retreat*” des Paul-Ehrlich-Instituts

Horn AV, Kamp C, Münk C, Löwer J, Schumann GG

„*Studies to elucidate the mechanism of LINE-1 inhibition by APOBEC3C*”

(29.08. - 31.08.2008) Forschungs-„*Retreat*” des Paul-Ehrlich-Instituts, Fürth

Horn AV, Kamp C, Münk C, Löwer J, Schumann GG

„*Unravelling the mechanism of inhibition of human LINE-1 retrotransposition by APOBEC3 proteins*”

(02.10. - 04.10.2009) Forschungs-„*Retreat*” des Paul-Ehrlich-Instituts, Fürth